UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II
Unités d'Enseignement et de Recherche des Sciences Médicales

ANNÉE 1973, THÈSE N° 657

APPLICATION DE LA RÉACTION HYDROXAMIQUE AU DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES DANS LES SELLES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
MENTION "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le mercredi 11 juillet 1973

par Martine DARGELOS née Faure

le 7 septembre 1946 à Talence (33)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. J. BAILENGER, Professeur, Président
P. MESNARD, Professeur,
R. PAUTRIZEL, Professeur,
R. GOLSE, Professeur,
R. CROCKETT, Professeur
} Juges

ACEMB - Editions - 75, cours de la Somme, Bordeaux

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549625_0028

Unités d'Enseignement et de Recherche des Sciences Médicales

ANNÉE 1973, THÈSE N° 657

APPLICATION DE LA RÉACTION HYDROXAMIQUE AU DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES DANS LES SELLES

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

MENTION "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le mercredi 11 juillet 1973

par Martine DARGELOS née Faure

le 7 septembre 1946 à Talence (33)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. J. BAILENGER, Professeur, Président
P. MESNARD, Professeur
R. PAUTRIZEL, Professeur
R. GOLSE, Professeur
R. CROCKETT, Professeur
} Juges

ACEMB - Editions - 75, cours de la Somme, Bordeaux

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

LE DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES FECAUX

I - INTERET PHYSIO-PATHOLOGIQUE

A - LA FLORE MICROBIENNE INTESTINALE

Les acides organiques fécaux sont, avec l'ammoniaque, produits par l'activité microbienne intestinale.
En effet, la digestion des aliments est glandulaire dans un premier temps, commençant dans la bouche et se terminant dans le caecum, puis microbienne dans un second temps, par le fait d'une flore microbienne apparaissant dans la partie terminale de l'iléon et proliférant dans le côlon.
Cette flore se répartit en deux groupes d'activités complémentaires:

1° - La flore saccharolytique
Principalement constituée de bactéries Gram négatif, vivant en milieu acide, assurant la digestion des glucides (amidon, cellulose tendre) par une réaction de fermentation avec production d'acides organiques. Cette flore se colore en bleu par l'iode ; elle prédomine à la fin de l'iléon et dans le caecum.

2° - La flore protéolytique
Moins abondante, essentiellement constituée de bactéries Gram positif, vivant en milieu alcalin et assurant la digestion des matières protéiques avec formation de produits alcalins dits de putréfaction. Cette flore se développe de plus en plus au fur et à mesure que la flore de fermentation disparait faute de glucides, c'est-à-dire à partir du côlon droit pour devenir prédominante dans le côlon gauche, siège des putréfactions primitives.

B - LES ACIDES ORGANIQUES

D'une façon générale, les acides organiques produits dans l'intestin sont des acides gras à chaine courte, volatils ou fixes (1, 2) :

- Acides volatils
  - ac. formique
  - ac. acétique
  - ac. propionique
  - ac. butyrique
  - ac. valérique

- Acides non volatils
  - ac. lactique
  - ac. succinique
  - ac. malique
  - ac. fumarique

Dans l'analyse courante, ils ne peuvent être différenciés. Seule la microchromatographie sur papier les sépare et les identifie (3).
En tenant compte de la sensibilité de cette méthode, ces acides sont classés en fonction de leur fréquence et de leur abondance dans les selles, dans l'ordre suivant (4) :

- ac. formique
- ac. acétique
- ac. propionique
- ac. butyrique
- ac. non volatils
- ac. valérique

C - PHYSIO-PATHOLOGIE

La muqueuse intestinale est très sensible à l'action de ces acides qui l'irritent, excitent le péristaltisme et augmentent la sécrétion de matières "albuminoïdes" par les cellules pariétales. Les produits alcalins des putréfactions primaires agissent de même. Les substrats protéiques ainsi mis à la disposition de la flore protéolytique en permettent la prolifération avec production d'ammoniaque au cours de putréfactions dites "secondaires". L'intensité de ces fermentations et de ces putréfactions est appréciée par l'analyse fécale de leurs produits, qui, en fait, rend compte de l'activité des flores correspondantes et de leur équilibre.
Physiologiquement, il existe entre les deux flores une sorte d'antagonisme qui empêche le développement exclusif de l'une aux dépens de l'autre et qui est tel que les taux d'acides organiques et de produits aminés sont constants.
Un déséquilibre entrainant des variations pathologiques de ces taux aura de nombreuses origines :

- l'exagération des fermentations dûe à une mauvaise habitude alimentaire par abus de glucides (régime végétarien) ou à une digestion glandulaire défectueuse de ces glucides. Ceci entraine souvent une accélération du péristaltisme, une colite et une hypersécrétion de la muqueuse aboutissant à une diarrhée. Le taux des acides organiques augmente.

- une déficience de la flore saccharolytique dûe à des putréfactions précoces (abus de protides) ou à un transit accéléré. Elle peut également provoquer une colite et les troubles précédents. Ici le taux des acides organiques est abaissé.

- une stagnation de la selle dans le côlon (constipation). Elle soustrait à la masse fécale par absorption, des substances solubles et peut entrainer secondairement une dilution par hypersécrétion de la muqueuse irritée (fausse diarrhée) diminuant le taux des acides organiques.

Tous les facteurs conditionnant le bon équilibre physiologique sont interdépendants : nous remarquons ainsi qu'une anomalie du transit, une insuffisance d'absorption peuvent déterminer diarrhée, constipation, fausse diarrhée et être la cause ou la conséquence de ce déséquilibre. Dans tous ces cas, des putréfactions secondaires se produisent, augmentent le taux d'ammoniaque et limitent sa valeur pour interpréter un trouble de la diges-

tion microbienne. Par conséquent le taux d'acides organiques dans les selles rend mieux compte de ce déséquilibre.
Il faut noter que pour une teneur normale en ammoniaque, le pH est déterminé par le taux des acides organiques : il diminue quand celui-ci augmente ; mais l'ammoniaque de putréfactions excessives peut neutraliser une importante quantité d'acides organiques donc augmenter le pH qui ne reflète plus le taux de ces acides. Si le pH est alcalin, il traduit des putréfactions ammoniacales secondaires sans laisser préjuger de leur formation.
Il est donc important de disposer d'une méthode dosant non seulement les acides organiques libres mais également ceux qui sont salifiés par les produits alcalins des selles.
Nous posséderons ainsi une image fidèle de l'orientation de l'activité microbienne.

-:-

II - METHODES ACTUELLES

La difficulté de séparer les acides organiques et la méconnaissance de leur signification individuelle conduisent à les doser d'une façon globale. A l'origine par une méthode basée sur la distillation, LARUE et LABBE (5) ne pouvaient recueillir que les acides volatils et ne tenaient pas compte des acides fixes (lactique, succinique etc...) susceptibles d'être contenus dans les selles.
Actuellement on mesure plus facilement sans distillation les acides organiques totaux : volatils et non volatils.
Différentes méthodes ont été proposées.

A - METHODE DE GOIFFON ET NEPVEUX

Cette méthode (6) est inspirée de celle de VAN SLYKE et PALMER pour les acides organiques urinaires (7)

1° - Principe

Les sels de calcium des acides de fermentation trouvés dans les selles sont solubles dans l'eau contrairement à ceux de l'acide carbonique, de l'acide oxalique, de l'acide phosphorique et des acides gras supérieurs non volatils (graisses acides). Dans ces conditions le dosage des acides sur un filtrat ne porte que sur les acides de fermentation.
Les acides organiques sont déplacés de leurs sels par l'acide chlorhydrique titré, qui, en excès provoque le virage de l'orangé IV, indicateur insensible à l'acidité des acides organiques libérés mais virant par un excès d'acide chlorhydrique.

2° - Technique

A 50 ml d'une dilution bien homogène de selles au $\frac{1}{10}$, on mélange 10 gouttes de chlorure ferrique (perchlorure de fer) $\frac{1}{10}$ sous forme de soluté officinal pour favoriser la filtration puis quelques gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine. On ajoute ensuite de la chaux hydratée pulvérisée en quantité suffisante pour obtenir une coloration rouge nette (2 grammes environ). On complète le volume par l'eau distillée jusqu'à 70 ml. Après 5 minutes de contact, on filtre en recueillant dans une éprouvette 25 ml de filtrat qui sont additionnés de quelques gouttes de phénolphtaléine à 0, 50 % et neutralisés : après addition d'acide chlorhydrique au $\frac{1}{10}$ jusqu'à décoloration, on revient à une couleur très faiblement rose par addition de soude $\frac{N}{10}$; on verse 5 ml de solution d'orangé IV à 0, 2°/00.
Le dosage se fait en ajoutant goutte à goutte une solution d'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$ jusqu'à l'obtention d'une teinte orangée qui doit persister après l'addition d'eau distillée amenant le volume total à 60 ml, et doit être exactement celle qu'on obtient en versant dans une éprouvette de même diamètre, 5 ml de solution d'orangé IV, 1, 2 ml d'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$ et une quantité suffisante d'eau distillée pour atteindre 60 ml.

3° - Résultats

On soustrait 1, 2ml du volume d'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$ employé pour avoir le volume d'acide chlorhydrique $\frac{N}{10}$ correspondant réellement à la quantité d'acides organiques contenus dans les 25 ml de filtrat soit dans 2, 5 g de selles.

En multipliant ce volume par 4, le chiffre obtenu correspond à la quantité d'acides organiques exprimée en HCl $\frac{N}{10}$ dans 10 g de selles.

Ce chiffre désigne encore la quantité d' $\frac{N}{10}$ acides organiques contenus dans 100 g de selles, en volume de solution N d'acide chlorhydrique.

Normalement il est de 14 à 16 ml.

4° - Inconvénients

Cette méthode emploie un indicateur, l'orangé IV, dont le virage est délicat à apprécier. Il s'agit d'une nuance de coloration passant du jaune à l'orangé, la selle étant, de plus, normalement colorée en jaune orangé.

Le terme colorimétrique consiste dans l'appréciation d'une égalité de coloration.

Cette méthode est peu pratique et peu sensible. On a donc recherché à modifier la technique tout en respectant le principe posé par GOIFFON.

B - METHODE DE GOIFFON ET NEPVEUX MODIFIEE PAR BAILENGER CLYTI ET LE HIR.

1° - Principe

Le principe est le même : c'est un dosage acidimétrique réalisé au moyen d'un excès d'acide chlorhydrique (8). Les modifications sont de deux ordres :

a) on utilise le bleu de bromophénol comme indicateur

b) on pratique une décoloration du filtrat par mélange avec une petite prise de charbon végétal et filtration

2° - Technique

On part d'une dilution de selles au $\frac{1}{10}$: 100 ml environ; on ajoute 1 ml de solution officinale de perchlorure de fer, puis 2 grammes environ de chaux hydratée pulvérisée.

On filtre après 5 minutes.

Le filtrat est mélangé à une petite prise de charbon végétal (2 grammes environ) qui fournit après une nouvelle filtration, un liquide incolore.

A 20 ml de ce filtrat, on ajoute 30 ml d'eau distillée environ et 2 gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine, on neutralise par de l'acide chlorhydrique en solution aqueuse à 2 % et on revient à une coloration rose très pâle par addition de soude $\frac{N}{10}$.

On verse ensuite 2 gouttes de solution alcoolique de bleu de bromophénol à 1 %.

Le dosage se fait en ajoutant goutte à goutte une solution d'acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$ jusqu'à virage du bleu au jaune.

3° - Résultats

Si V est le volume d'acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$ ajouté pour obtenir le virage, il représente l'acidité correspondant au volume d'acides organiques contenus dans 20 ml de filtrat soit dans 2 grammes de selles.
V x 50 indique le nombre de ml d'acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$ pour 100 g. de selles.
V x 10 indique le nombre de ml d'acide chlorhydrique N pour 100 g. de selles.
Il suffit donc de multiplier par 10 le nombre de ml d'acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$ employés, pour connaitre le nombre de ml d'acide chlorhydrique N qui correspondent à 100 g. de selles
Normalement, il est de 14 à 16 ml.

4° - Avantages et inconvénients

Les conditions de ce dosage acidimétrique offrent une plus grande sensibilité liée à une facilité de lecture que l'on ne rencontrait pas avec la technique colorimétrique.
Toutefois le virage de l'indicateur n'est bien apprécié qu'en utilisant un filtrat incolore, d'où l'emploi de charbon végétal.
La pratique montre un risque d'absorption des acides à doser par ce réactif.

C - RECHERCHE D'UNE METHODE NOUVELLE

Nous avons recherché une réaction applicable à tous les acides organiques fécaux et ne donnant pas d'interférences avec les acides présents dans les selles mais sans intérêt physiopathologique. Cette réaction doit être facile à réaliser pour permettre un dosage de biologie clinique. Elle doit aussi être suffisamment sensible pour s'appliquer à un milieu biologique dont la teneur en acides est relativement faible.
Après divers essais nous nous sommes arrêtés à la réaction hydroxamique des acides aliphatiques proposée par PESEZ et aboutissant à une réaction colorée (9).

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

PREMIERE PARTIE

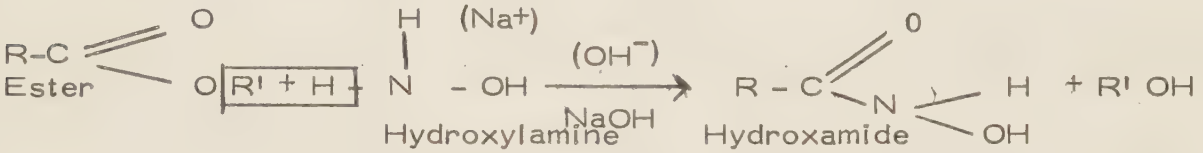
LA REACTION DE PESEZ

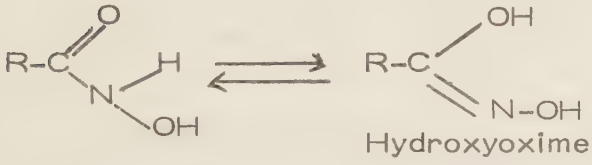
I - TECHNIQUE ORIGINALE DE PESEZ

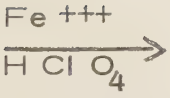
Il s'agit de la réaction hydroxamique appliquée aux acides aliphatiques par PESEZ (9).

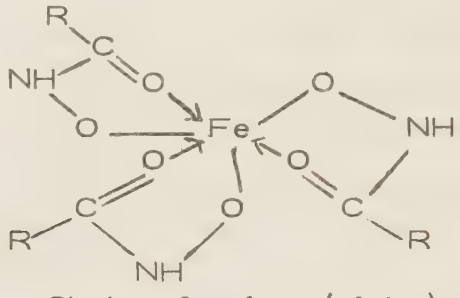
A - PRINCIPE

La formation d'acides hydroxamiques à partir des chlorures, anhydrides, esters et amides, a été appliquée à l'analyse par FEIGL (10). La réaction avec l'hydroxylamine en milieu alcalin donne dans un premier temps un acide hydroxamique fournissant dans un deuxième temps avec des ions ferriques en milieu acide un chelate ferrique violet dont on lit l'intensité de la coloration au photomètre à 500 nm.



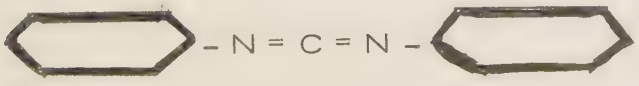




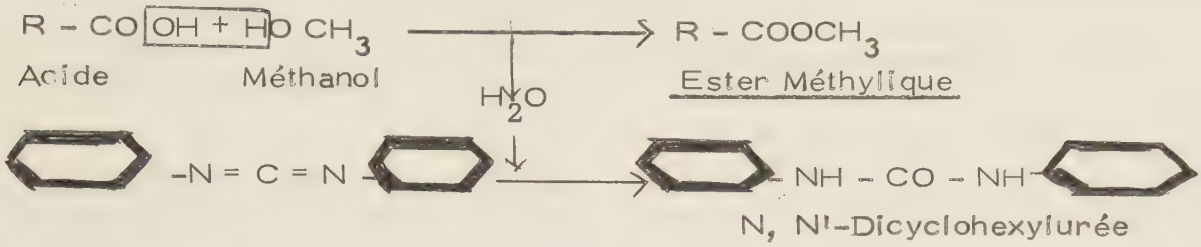


Chelate ferrique (violet)

Dans les mêmes conditions opératoires, les acides libres ne réagissent pas avec l'hydroxylamine. PESEZ estérifie à la température ordinaire les acides aliphatiques par le méthanol et réalise la réaction hydroxamique avec les esters méthyliques obtenus.
Cependant l'estérification directe par le méthanol est sélective pour l'acide formique et nécessite un pH voisin de zéro pour avoir un rendement satisfaisant. A un pH supérieur à 3 pour l'acide formique et quelle que soit la valeur du pH pour les autres acides, la réaction est négative, l'estérification n'ayant pas lieu dans de bonnes conditions. La condensation des autres acides aliphatiques peut être réalisée en présence de N, N'-dicyclohexylcarbodiimide à un pH moins acide ; pour l'acide acétique, en particulier, il est de 3.



Le N, N'-dicyclohexylcarbodiimide fixe les éléments de l'eau permettant une meilleure estérification par le méthanol.



B - TECHNIQUE

1° - Réactifs

. Solution méthanolique à 1 % de N N' (1)
. Solution méthanolique à 10 % de chlorhydrate d'hydroxylamine
. Solution méthanolique à 10 % de soude
. Solution-mère de perchlorate ferrique obtenue en dissolvant 0, 8 g de fer en poudre dans 10 ml d'acide perchlorique à 70 % jusqu'à ce que la réaction s'amorce. Diluer par 10 ml d'eau distillée. Compléter à 100 ml avec de l'éthanol à 95 °C.
. Réactif dilué au perchlorate ferrique préparé extemporanément à partir de 4 ml de solution-mère acidifiée par 1, 2 ml d'acide perchlorique à 70 %. Compléter à 100 ml avec de l'éthanol à 95 °C.
. Acide chlorhydrique N (36, 5 g/l)

2° - Mode opératoire

Ajuster la solution aqueuse acide à pH 3, au pH-mètre, par quelques gouttes d'acide chlorhydrique N.
A 0, 5 ml de cette solution, ajouter 1 ml de solution méthanolique de N N' (nous appelons cette solution réactif N N')
Après 15 minutes, introduire 1 ml de réactif hydroxylamine-soude filtré, obtenu par mélange, à parties égales, des solutions méthanoliques de chlorhydrate d'hydroxylamine et de soude.
15 minutes plus tard, ajouter 10 ml de réactif dilué au perchlorate ferrique qui développe aussitôt une coloration violette que l'on lit au spectrophotomètre à 500 nm en cuve de 10 mm.

C - RESULTATS

1° - Indications

D'après PESEZ, la réaction est applicable aux acides aliphatiques dont il établit une liste :
. acides simples : formique, acétique, propionique, butyrique.
. acides-alcools : tartrique, malique, citrique.
. diacides : oxalique, succinique.

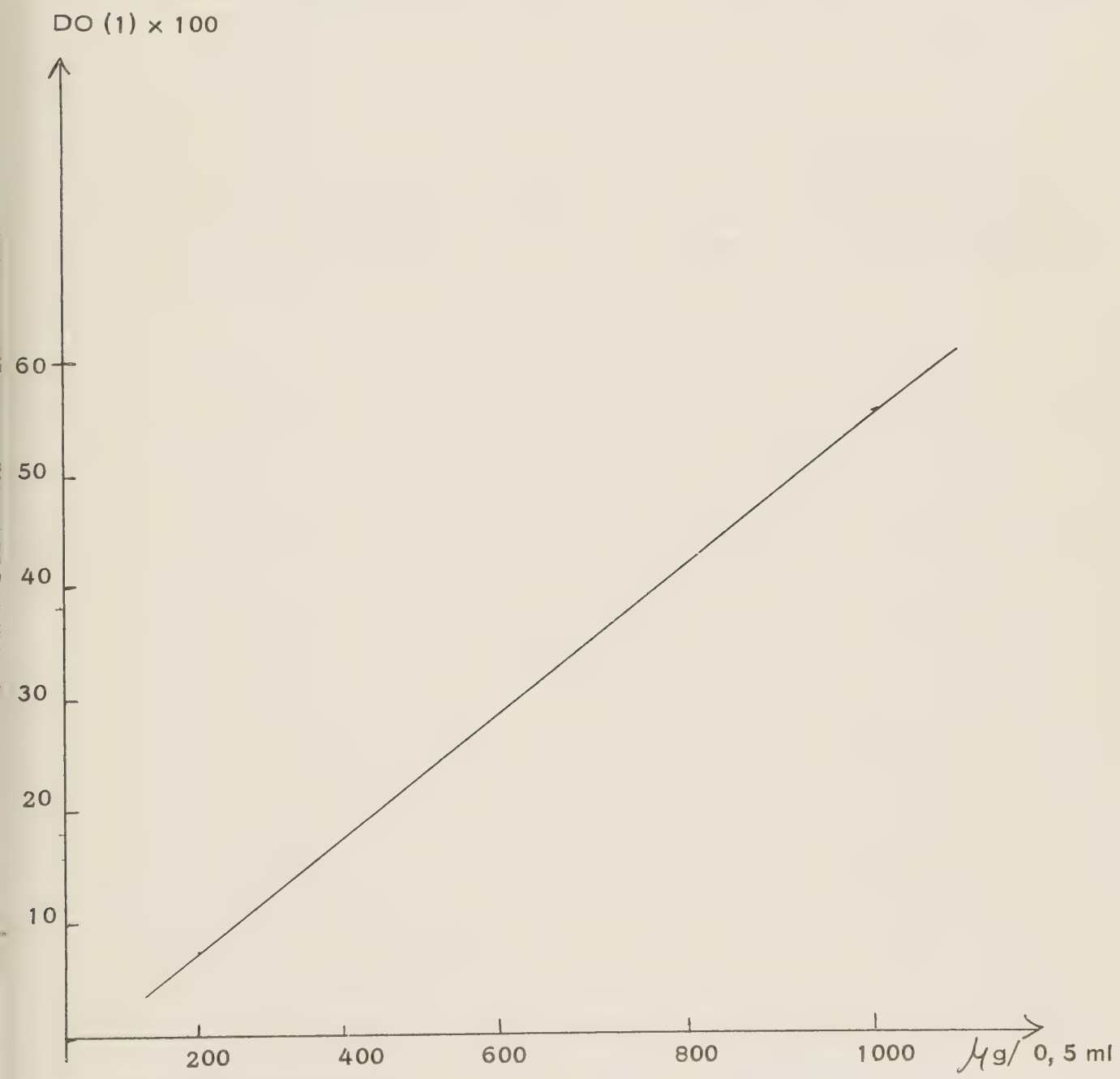
2° - Caractère quantitatif

PESEZ représente graphiquement les variations de densité optique en fonction du poids d'acide dosé (en μg) et obtient une droite. Le graphique I correspond au dosage de l'acide acétique à pH 3 : la coloration

(1) N N' - dicyclohexylcarbodiimide.

suit la loi de BEER-LAMBERT et permet de déterminer la concentration d'une solution d'acide acétique (connaissant le volume de prise d'essai : ici 0, 5 ml) à partir de la densité optique obtenue après réaction. Par exemple, la densité optique de 0, 30 correspond à 600 µg d'acide acétique. La prise d'essai étant de 0, 5 ml, la concentration cherchée est 1200 µg/ml soit un titre de $\frac{N}{50}$.

Graphique I d'après PESEZ (9)
Dosage de l'acide acétique en présence de réactif déshydratant à pH 3, à 500 nm.



(1) DO = Densité optique

Un dosage est donc possible mais PESEZ n'a vérifié le domaine d'application de la loi de BEER - LAMBERT que pour les acides formique et acétique.

3° - Sensibilité

Nous ne décelons la densité optique qu'à partir d'une certaine concentration de la solution. Nous retenons seulement les valeurs de densité optique supérieures à 0,08 pour supprimer les risques d'erreur de lecture possibles avec de très faibles chiffres. D'après les résultats de PESEZ, le seuil ainsi défini est de 100 µg dans 0,5 ml à pH zéro pour l'acide formique sans le réactif N N' et s'élève à 200 µ g à pH3 en présence de ce réactif pour l'acide acétique (soit un titre de $\frac{N}{150}$).

D - POSSIBILITES D'APPLICATION BIOLOGIQUE

Cette réaction colorimétrique est donnée par les acides qui nous intéressent (exception faite pour l'acide oxalique qu'il nous faudra éliminer) ; elle parait quantitative et sensible, caractères qui permettent de retenir cette réaction en vue d'une application au dosage des acides organiques fécaux. Pour un tel dosage nous devons aussi assurer la reproductibilité de la réaction.

-:-

II - ETUDE EXPERIMENTALE ANALYTIQUE

Il importait en effet de préciser les caractéristiques de la réaction de PESEZ et de les étendre au problème particulier que constitue son application au dosage des acides organiques de fermentation dans les matières fécales, de façon à obtenir le maximum de reproductibilité et de sensibilité.

PESEZ décrivait une réaction quantitative dans les conditions ci-dessous :

- 0, 5 ml de prise d'essai
- 1 ml de réactif N N'

Contact 15 minutes

- 1 ml de réactif hydroxylamine-soude

Contact 15 minutes

- 10 ml de réactif au perchlorate.

Nous complétons son analyse par le développement des points suivants :

. qualité des réactifs utilisés

. éléments conditionnant la reproductibilité de la réaction : blanc réactif ; pH ; délai de lecture.

A ce moment-là seulement nous étudierons le caractère quantitatif pour chaque acide et la sensibilité.

A - QUALITE DES REACTIFS UTILISES

Comme il s'agit d'une réaction colorimétrique, la limpidité et la pureté des solutions sont nécessaires à l'obtention d'une coloration spécifique. Leur préparation et leur conservation doivent être définies.

1° - Préparation

Les réactifs que nous avons précédemment cités sont toujours préparés de la même façon, pesés et mesurés très précisément et à partir de produits purs.

La réaction de PESEZ débutant par une phase de déshydratation par le réactif N N', il faut donc obtenir des réactifs anhydres : une verrerie parfaitement sèche est indispensable.

a) Méthanol

Le méthanol employé ne doit contenir ni eau ni esters susceptibles de développer la réaction, donc il est nécessaire de le redistiller en présence de chlorure de calcium anhydre.

b) Réactif N N'

Le N N' dicyclohexylcarbodiimide est une pâte blanchâtre à température ordinaire qui devient fluide et incolore à chaud. Pour le mettre en solution, on place le flacon pendant 10 minutes à 60 ° C maximum et on prélève la zone supérieure liquéfiée avec une pipette placée également quelques minutes à 60 ° C. La solution à 1 % dans le méthanol absolu est limpide. Le N N' doit être en solution suffisamment concentrée pour déshydrater, mais pas trop, car, insoluble dans l'eau, il précipite en sa présence.

c) Solution méthanolique d'hydroxylamine

Le chlorhydrate d'hydroxylamine est une poudre blanche qui est soluble dans le méthanol si sa concentration n'excède pas 10 %. Nous faisons une solution à 10 % en agitant fréquemment le flacon jusqu'à limpidité parfaite.

d) Solution méthanolique de soude

La soude en pastilles n'est pas entièrement solubilisée à 10 % dans le méthanol même en chauffant au bain marie bouillant. Un dépôt assez important demeure et doit être mis en solution : il faut attendre environ 12 heures.

e) Réactif hydroxylamine-soude

Au moment de la réaction, on mélange, à parties égales, les deux solutions précédentes. Il se produit un abondant précipité blanc, on récupère le filtrat clair.

f) Réactif au perchlorate ferrique

α) Solution-mère

On l'obtient par action d'acide perchlorique sur du fer en poudre. Cette préparation doit être faite avec de très grandes précautions, car si cette réaction, très exothermique, s'emballe trop, une explosion risque de se produire.

Dissoudre 0,8 g de fer dans 10 ml d'acide perchlorique à 70 % jusqu'à ce que la réaction s'amorce. Ceci se fait dans un matras à long col et verre épais. Il est nécessaire de s'aider d'une très faible élévation de température que l'on obtient avec un bain marie chauffé peu à peu jusqu'à 60° 65°. Un dégagement de chlore se produit. Diluer alors par 10 ml d'eau distillée. Compléter à 100 ml avec de l'éthanol à 95 ^{C}. En général un très léger dépôt de fer qui n'a pas réagi reste au fond du flacon. Agiter avant de prélever pour préparer le réactif dilué.

β) Réactif prêt à l'emploi

On acidifie 4 ml de solution-mère par 1,2 ml d'acide perchlorique à 70 % et on complète à 100 ml avec de l'éthanol à 95 ^{C}. On obtient une solution jaune limpide.

2° - Conservation

Lors du mélange de la solution acide aqueuse avec le réactif N N', un trouble apparait. Celui-ci persiste jusqu'à l'addition du réactif hydroxylamine-soude. Le liquide devient alors limpide.

Cependant si le réactif N N' n'est pas récemment préparé, mais conservé depuis quelques jours, le trouble ne se produit pas ; il peut cependant apparaître avec l'hydroxylamine. Le réactif au perchlorate le fait disparaître. L'état des réactifs se modifie donc au cours de leur conservation :

. soit par suite d'une mauvaise préparation
. soit par suite d'une hydratation
. soit par suite d'une altération de certaines fonctions (oxydation de l'hydroxylamine)

Les réactifs ne sont pas stables.

Dans tous les essais, nous utiliserons donc des solutions préparées

extemporanément, de façon à ne pas avoir de variations dans les réponses. Ultérieurement nous préciserons les conditions de leur conservation (2ème partie, chap. III).

B - ELEMENTS CONDITIONNANT LA REPRODUCTIBILITE DE LA REACTION.

Après avoir défini chaque paramètre de la réaction, nous en discuterons les conséquences en nous plaçant du point de vue de la reproductibilité.

1° - Blanc réactif

Pour faire le zéro du spectrophotomètre nous utilisons un blanc préparé à partir d'eau distillée ramenée au pH de réaction par quelques gouttes d'acide chlorhydrique N et traité avec les mêmes réactifs et dans les mêmes conditions que la solution acide à tester. Son intérêt, nous le verrons, est de refléter la qualité des réactifs ainsi que la conduite de la réaction. Il apparait comme une solution limpide et jaune pâle, couleur dûe principalement au perchlorate ferrique.

2° - pH

PESEZ remarque l'importance du pH dans la réaction. Cette influence semble d'ailleurs se faire sentir différemment selon les acides et la présence du réactif N N'. Nous testons à différents pH, les principaux acides susceptibles d'être contenus dans les selles, en nous plaçant en présence du réactif N N'.

a) Concentration des solutions acides

Chaque acide est dilué au $\frac{1}{1000}$ dans de l'eau distillée (1000 μg/ml) de telle façon que nous obtenions une solution ajustée au pH voulu, soit à l'aide d'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$, soit à l'aide de soude N.
Nous notons en particulier que l'acide formique à 1000 μg/ml a directement un pH de 3.
La prise d'essai étant de 0, 5 ml, contient 500 μ g d'acide.

b) pH choisis

Les acides fréquents et abondants dans les selles (ac. formique, ac. acétique, ac. propionique, ac. lactique, ac. malique) sont dosés aux 5 pH suivants : 4, 3, 2, 1, 0, 5.
Les acides d'importance moindre (ac. succinique, ac. valérique) sont étudiés seulement aux pH 3 et 1.
Nous étudions aussi à ces deux pH, deux autres acides (ac. oxalique, ac. phosphorique) qui ne sont pas des produits de fermentation mais des constituants normaux des selles, pour voir leur interférence possible et savoir s'il est nécessaire de les éliminer comme dans la méthode de GOIFFON.

3° - Lecture

PESEZ ne signale pas que la coloration développée immédiatement après l'addition des 10 ml de réactif au perchlorate est instable : on suit sa diminution en fonction du temps, en mesurant la densité optique au bout de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, et 60 minutes, le zéro du spectrophotomètre

étant fait avec le blanc réactif correspondant au pH testé. Les densités optiques inférieures à 0, 08 ne sont pas retenues.

4° - Résultats

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux et de graphiques traduisant la densité optique en fonction du temps de lecture et du pH:

. Acide formique (tableau I graph. II)

Le graphique II montre que les pH 1, 2 et 3 sont optimum. Mais la diminution de la densité optique est plus rapide à pH 2. Le pH 0, 5 ne convient pas, contrairement aux résultats de PESEZ qui notait la densité optique la plus forte à pH zéro. Mais cet auteur travaillait en l'absence du réactif déshydratant N N'. La coloration diminue donc rapidement lorsqu'il s'agit de l'acide formique. Peu à peu, d'ailleurs, la solution devient totalement incolore.

. Acide acétique (tableau II graph. III)

La densité optique est la plus élevée à pH 3. Elle diminue lentement en fonction du temps et ne devient jamais nulle.

Aux pH 4 et 2 elle est faible et est pratiquement nulle aux pH 1 et 0, 5.

. Acide propionique (tableau III graph. IV)

Le pH 3 est optimum et la diminution de la densité optique est lente en fonction du temps. La coloration est faible aux pH 4 et 2 et pratiquement nulle aux pH 1 et 0, 5.

. Acide lactique (tableau IV graph. V)

La densité optique la plus satisfaisante est obtenue pour pH 3. Sa diminution en fonction du temps est lente.

A pH 2, pH 1 et pH 0, 5, la coloration est encore élevée contrairement aux observations faites avec les acides volatils autres que l'acide formique.

. Acide malique (tableau V graph. VI)

La coloration est nettement plus élevée à pH 3 mais elle diminue assez vite. Elle est faible aux pH 4 et 2 et nulle aux pH 1 et 0, 5.

. Acide succinique (tableau VI)

. Acide fumarique (tableau VII)

. Acide butyrique (tableau VIII)

Pour ces trois acides la réaction colorée est maximum à pH 3.

A pH 1, les densités optiques obtenues sont pratiquement nulles.

. Acide valérique

Il forme avec l'eau une émulsion mais à la concentration de 1000 µg/ml, il y a miscibilité.

A une concentration supérieure, il est soluble dans le méthanol. A pH 3 la densité optique est inférieure à 0, 08 en 2 minutes. A pH 1, elle est nulle.

Pour toutes ces solutions à 1000 µg/ml, nous constatons qu'au fur et à mesure que le poids moléculaire de l'acide augmente, l'intensité de la réaction colorée de PESEZ diminue. Les acides de faible poids moléculaire (ac. formique, ac. acétique) qui sont les plus abondants dans les selles donnent la réaction la plus colorée à cette concentration.

. Acide oxalique

Contrairement aux résultats publiés par PESEZ, nous n'avons pas obtenu de réaction à pH 3 avec l'acide oxalique jusqu'à une concentration élevée de 37 000 µg/ml. Si nous n'éliminons pas cet acide de la selle, son interférence ne semble pas être à craindre.

Toutefois, il convient de noter qu'au dessus de 37 000 µg/ml un trouble apparait, et à 50 000 µg/ ml un abondant précipité gêne la lecture.

TABLEAU I

Influence du pH sur le dosage d'une solution d'acide formique à 1000 µg/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
4	24	20	18	18	16	12	10	9
3	61, 5	58	57	54	50, 5	47	39	34
2	61	55	46, 5	40, 5	36	32	29	28
1	60	57, 5	54	50	48	42, 5	38	34
0, 5	<8							

GRAPHIQUE II

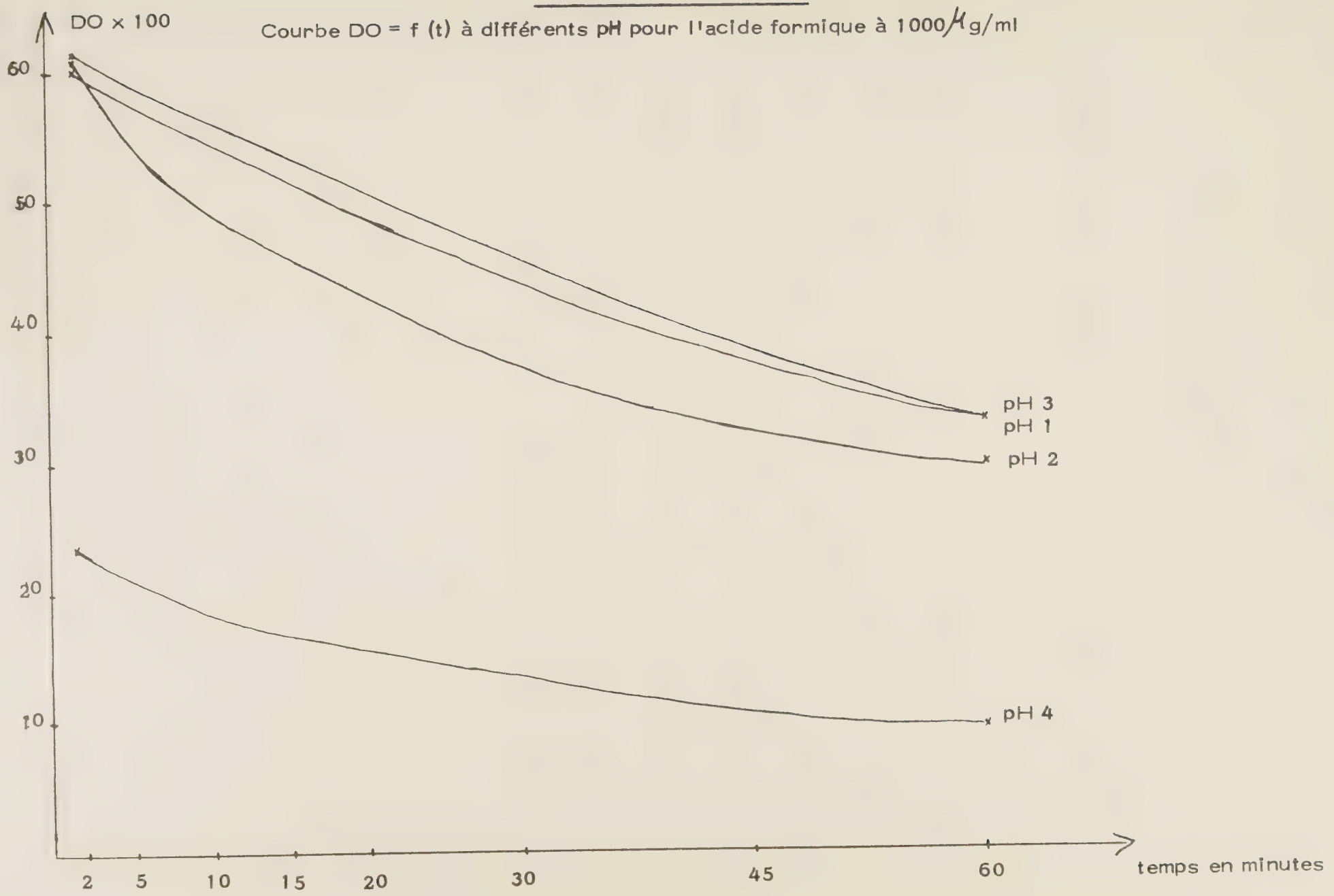


TABLEAU II

Influence du pH sur le dosage d'une solution d'acide acétique à 1000/M g/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
4	31	29	26	24	22	19	17	15
3	37	36	35	34	33, 5	33	32	30, 5
2	33	31	30	28	26	23	20	18
1	< 8							
0, 5	< 8							

GRAPHIQUE III

Courbe DO = f(t) à différents pH pour l'acide acétique à 1000 µg/ml

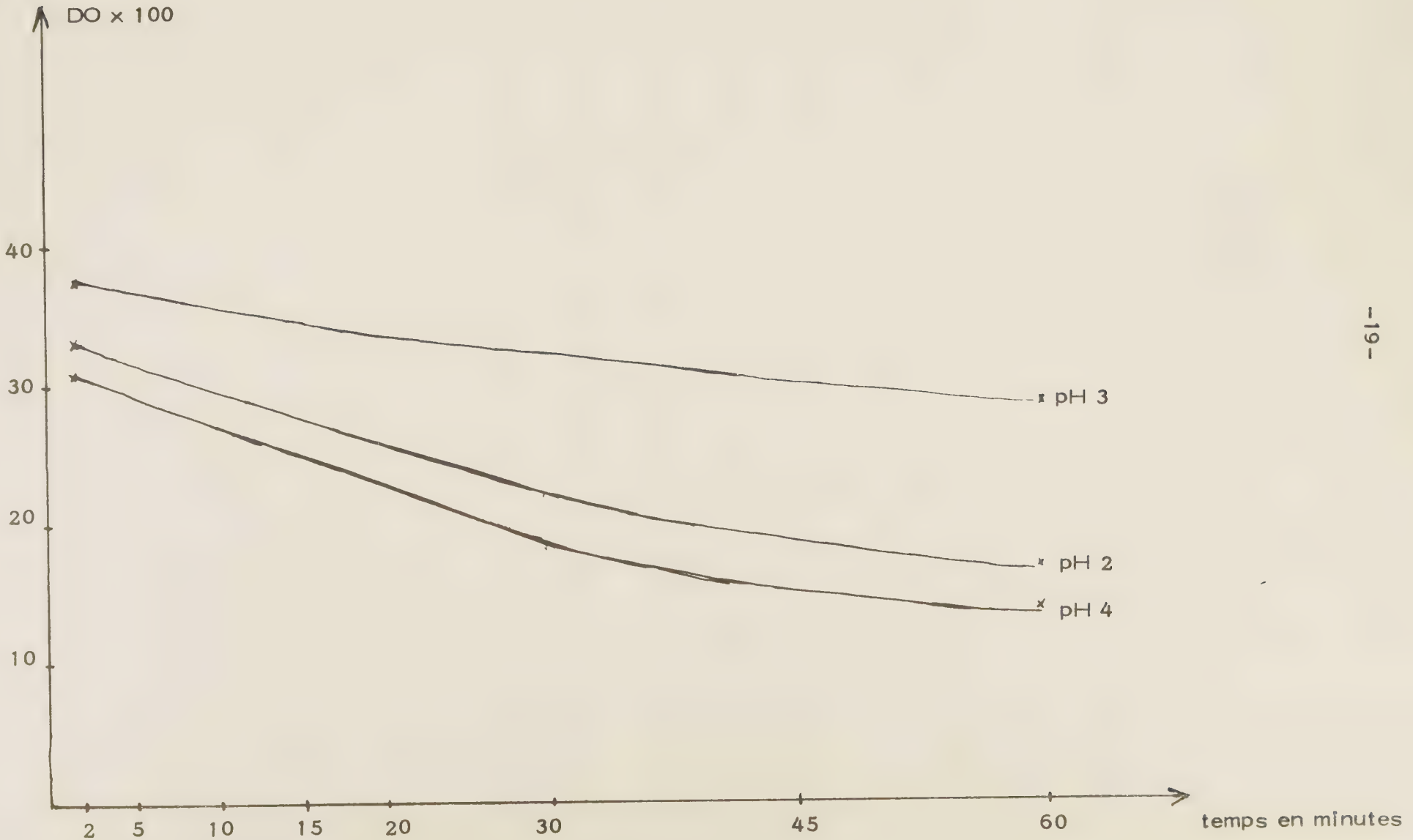


TABLEAU III

Influence du pH sur le dosage d'une solution d'acide propionique à 1000 µg/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
4	16	14, 5	14	13	12	10	10	9
3	21	20	19, 5	19	19	18	18	18
2	12, 5	12	12	11	11	10	10	9
1	< 8							
0, 5	< 8							

GRAPHIQUE IV

Courbe DO = f (t) à différents pH pour l'acide propionique à 1000 µg/ml

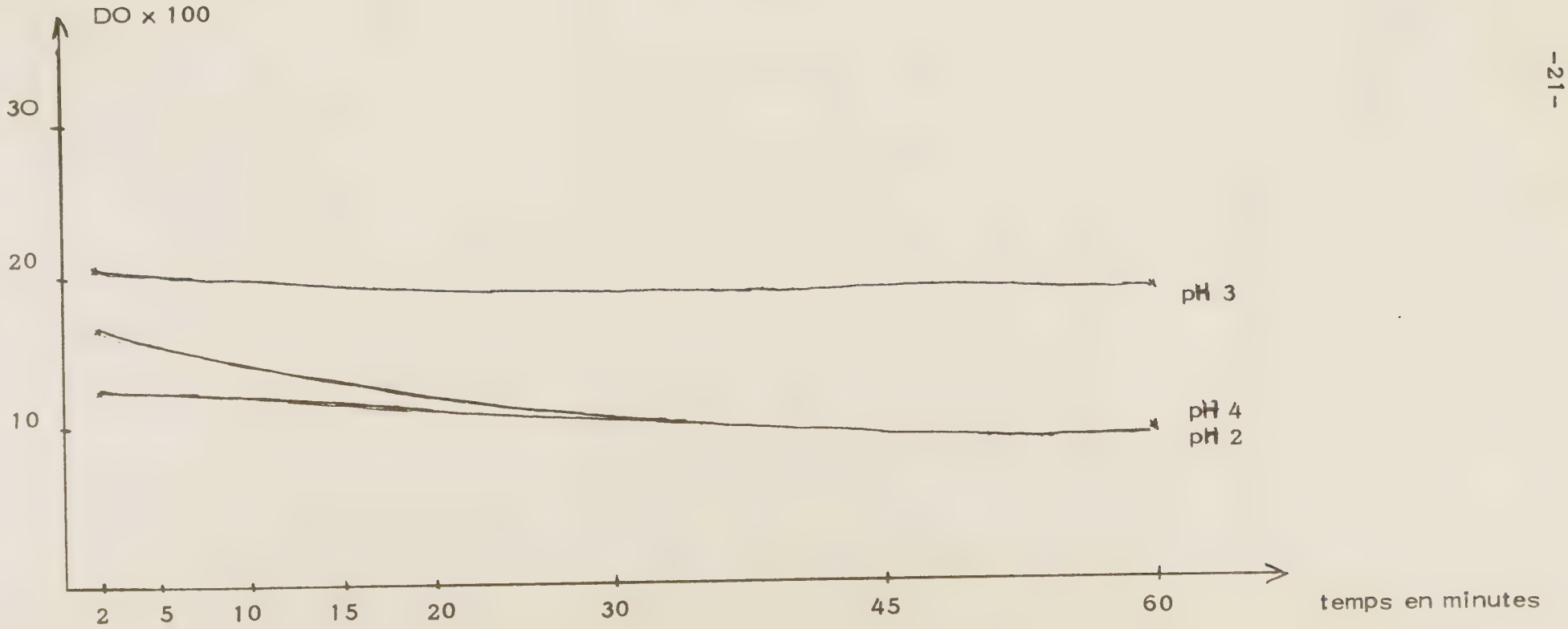


TABLEAU IV

Influence du pH sur le dosage d'une solution d'acide lactique à 1000 µg/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
4	34	32	30	29	27	26	25, 5	25
3	42, 5	41, 5	40, 5	38, 5	36, 5	35, 5	35	34
2	29	28	26	24	23	22, 5	21, 5	21
1	25, 5	24	23, 5	23	22, 5	22, 5	21, 5	21
0, 5	25, 5	24	23, 5	23	23	22, 5	21, 5	21

GRAPHIQUE V

Courbe DO = f (t) à différents pH pour l'acide lactique à 1000 µg/ml

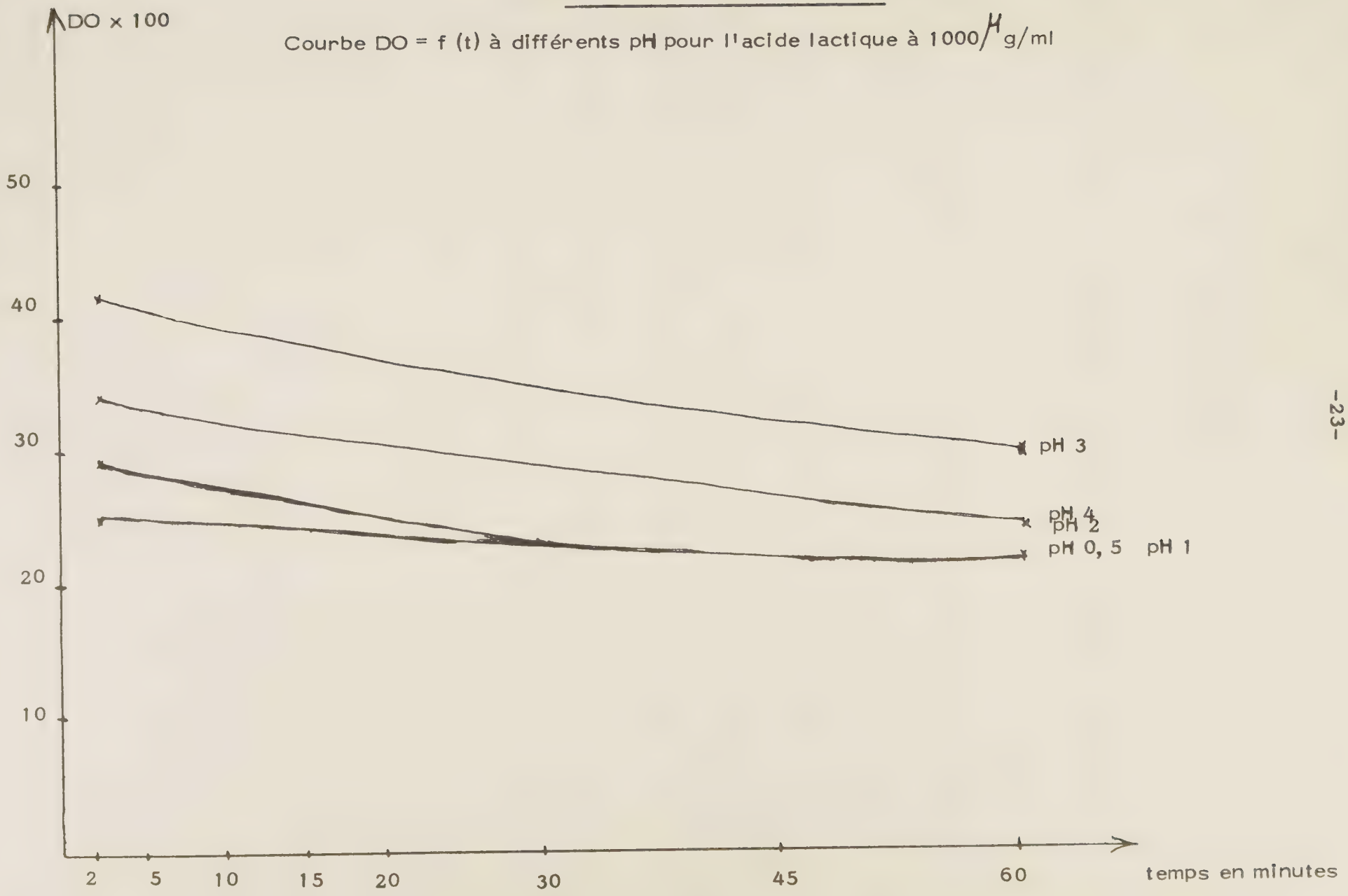


TABLEAU V

Influence du pH sur le dosage d'une solution d'acide malique à 1000 µg/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
4	22	20	19	18	17	15, 5	15	14
3	47, 5	45	43	40	38	36	34	32, 5
2	19, 5	18	17	16	15, 5	15	15	14
1	0							
0, 5	0							

GRAPHIQUE VI

Courbe DO = f (t) à différents pH pour l'acide malique à 1000 µg/ml

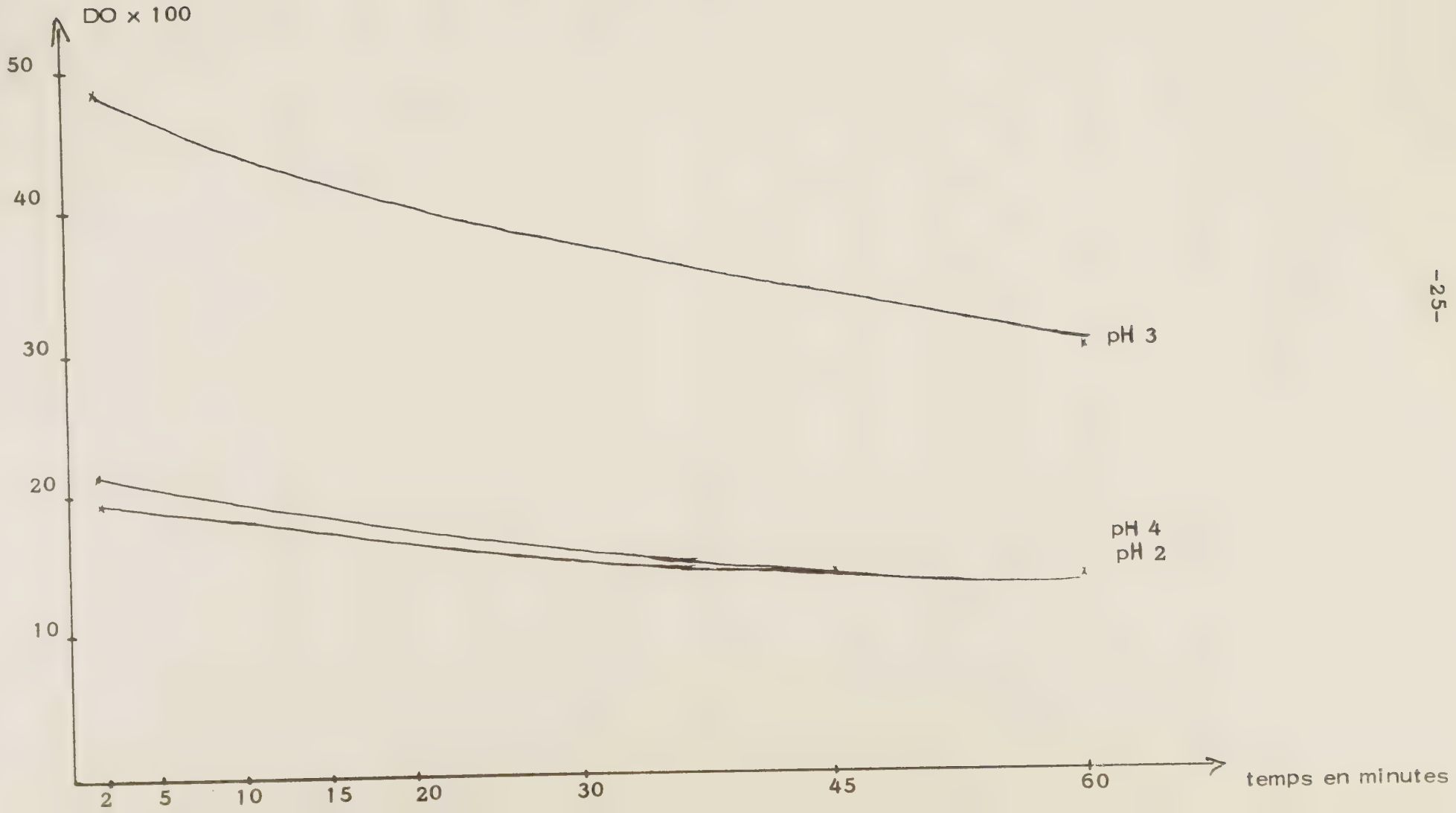


TABLEAU VI

Influence du pH sur le dosage de l'acide succinique à 1 000 µg/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
3	36	34, 5	34	33, 5	33	32	31	31
1	0							

TABLEAU VII

Influence du pHsur le dosage de l'acide fumarique à 1000 µg/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
3	16	15	14	13, 5	13	13	12, 5	12
1	<8							

TABLEAU VIII

Influence du pH sur le dosage de l'acide butyrique à 1000 µg/ml (DO x 100)

temps en minutes pH	2	5	10	15	20	30	45	60
3	12, 5	11, 5	11	11	11	10	10	10
1	<8							

. Acide phosphorique

A la concentration de 1000/µg/ml et à pH 3 cet acide ne donne pas la réaction ; à pH 1 celle-ci est très faible (densité optique < 0, 08). Il faut noter que lors de la réaction, la solution se trouble quand on ajoute le réactif hydroxylamine-soude. L'addition du réactif au perchlorate ne fait disparaître ce précipité que si la concentration de la solution d'acide phosphorique est inférieure à 2000/µg/ml. Il est donc prudent d'éliminer cet acide car nous ne pouvons connaitre sa concentration dans la selle.

5° - Remarques

a) Précision du pH

La précision du pH choisi est indispensable à la sensibilité de la réaction, ainsi que le prouve l'expérience suivante : ajustons les solutions d'acide formique et d'acide acétique à 1000/µg/ml aux trois pH; 3, 5 - 3 et 2, 5. Notons que l'acide acétique à 1000/µg/ml a directement un pH de 3, 5 et l'acide formique à 1000/µg/ml un pH de 3.

Nous lisons au spectrophotomètre au bout de cinq minutes les densités optiques obtenues contre les blancs correspondants. Comme le montre le tableau suivant, le pH 3 donne les meilleurs résultats (DO x 100)

Acide pH	Formique	Acétique	Résultats
3, 5	38	28	sensibilité faible
3	58	36	pH optimum
2, 5	50	34	sensibilité moindre

Un pH légèrement inférieur à 3 diminue moins la densité optique qu'un pH supérieur.

b) Intérêt du blanc réactif par rapport à l'eau distillée

Il s'agit d'étudier la coloration de base du blanc réactif qui nous sert de zéro dans la lecture au spectrophotomètre. Nous travaillons à pH 3 : le blanc réactif est donc préparé à partir d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à $\frac{N}{1000}$ qui a, par définition, ce pH (1).

Nous effectuons la réaction de PESEZ à la fois sur cette solution et sur celles d'acide formique et d'acide acétique à 1000/µg/ml, toutes deux ajustées à pH 3. La lecture en fonction du temps est faite :

. d'une part contre de l'eau distillée

. d'autre part contre le blanc réactif.

(1) $pH = - \log (H^+)$

Nous traçons les courbes de dosage dans les deux cas (graph. VII et graph. VIII) : les allures des courbes sont identiques, c'est-à-dire que la diminution de la coloration des dosages est du même ordre mais à deux niveaux différents. La coloration de base du blanc réactif (de densité optique stable voisine de 0, 10) abaisse simplement de façon régulière la densité optique des solutions dosées. Son intérêt par rapport à l'eau distillée dans la lecture photométrique est d'être témoin de la qualité des réactifs et de la conduite de la réaction (trouble éventuel, coloration parasite).

6° - Conclusions concernant ces éléments de reproductibilité

a) Le pH optimum de réaction en présence du réactif N N' est le même pour tous les acides de fermentation que nous avons à doser : il est égal à 3. Cette technique est donc utilisable pour le dosage fécal car, dans les selles, tous les acides seront décelés quelle que soit leur proportion. A ce pH, les acides oxalique et phosphorique n'interfèrent pas si leur concentration est faible, mais il sera prudent de les éliminer pour éviter les risques de précipitation auxquels ils peuvent donner lieu.

b) Malgré la diminution de densité optique qui en résulte, nous lisons le dosage contre un blanc réactif et non contre de l'eau distillée car il nous faut un témoin de l'état des réactifs, tous assez instables.

c) Etant donné l'instabilité de la coloration, la reproductibilité impose de lire le dosage et son blanc au bout d'un temps défini arbitrairement, mais toujours le même pour tous les essais ; pour que la réaction soit sensible, ce temps devra être assez court après l'addition du réactif au perchlorate. Un délai de lecture de cinq minutes nous a semblé satisfaisant.

d) L'ajustage à pH 3 doit être effectué très précisément au pH-mètre

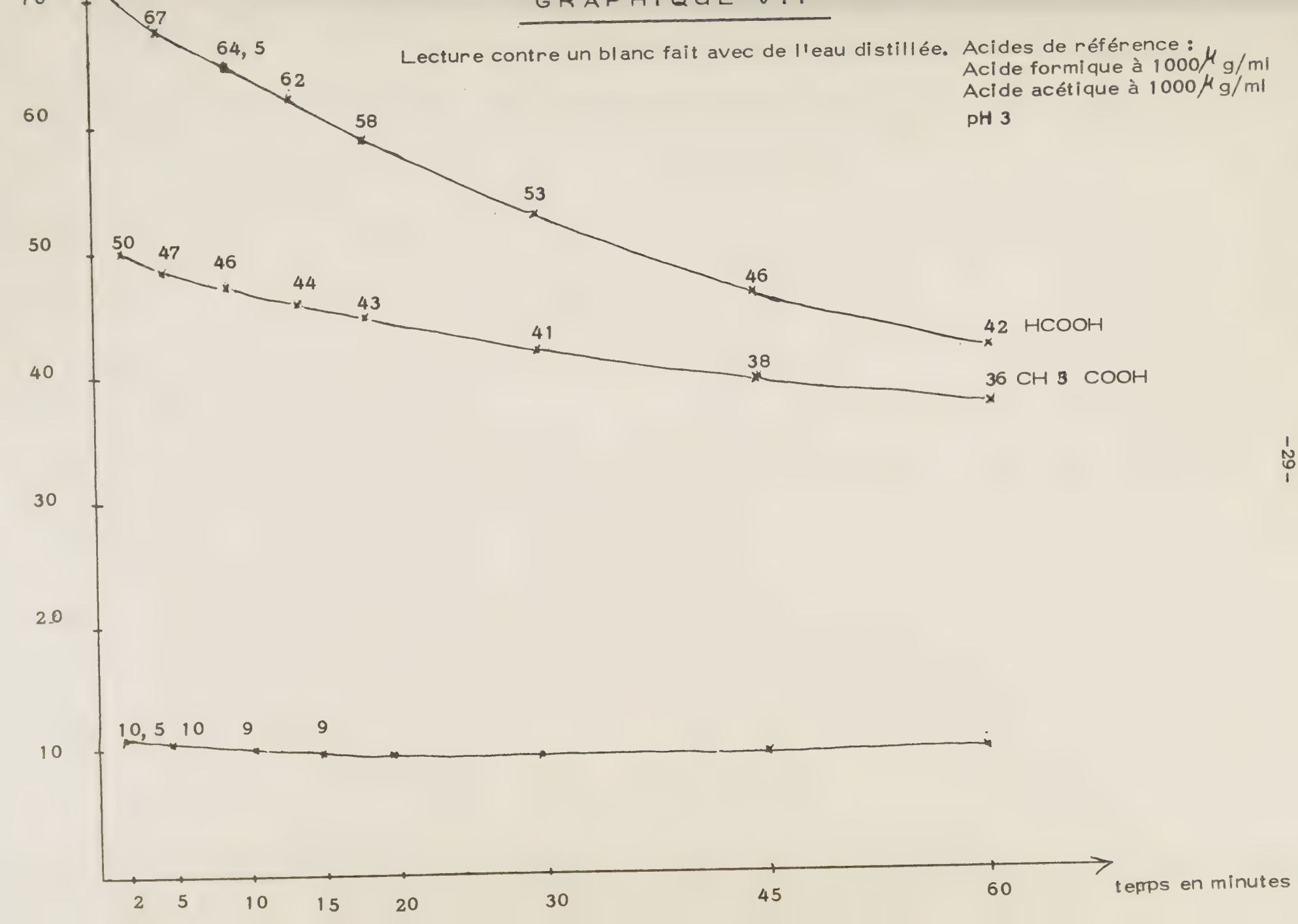
C - CARACTERE QUANTITATIF

PESEZ n'a vérifié le domaine d'application de la loi de BEER-LAMBERT que pour les acides formique et acétique. Nous allons ici, pour chaque acide, représenter graphiquement les variations de densité optique en fonction du poids d'acide dosé.
Ces acides de fermentation sont tous des monoacides ou des diacides : tableau IX. PESEZ définit pour l'acide acétique à pH 3 en présence de réactif N N' un seuil de sensibilité de 200 µg correspondant à une solution $\frac{N}{150}$ puisque la prise d'essai est de 0, 5 ml. Nos titres vont donc croissant de $\frac{N}{250}$ à $\frac{N}{10}$ et sont exprimés aussi, pour chacune des solutions acides, en µg dans 0, 5 ml (poids d'acide dans la prise d'essai) : tableau X.
Les acides sont dilués dans l'eau distillée sauf l'acide valérique qui forme une émulsion : nous le solubilisons alors dans du méthanol. Chaque solution est ajustée à pH 3 par l'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$ ou la soude N. La réaction de PESEZ effectuée avec ces différentes dilutions, dans les conditions codifiées précédemment (blanc réactif, temps de lecture de 5 minutes, pH 3, réactifs extemporanés) permet l'établissement du tableau XI et des graphiques IX à XVII.

GRAPHIQUE VII

Lecture contre un blanc fait avec de l'eau distillée.

Acides de référence :
Acide formique à 1000 µ g/ml
Acide acétique à 1000 µ g/ml
pH 3



GRAPHIQUE VIII

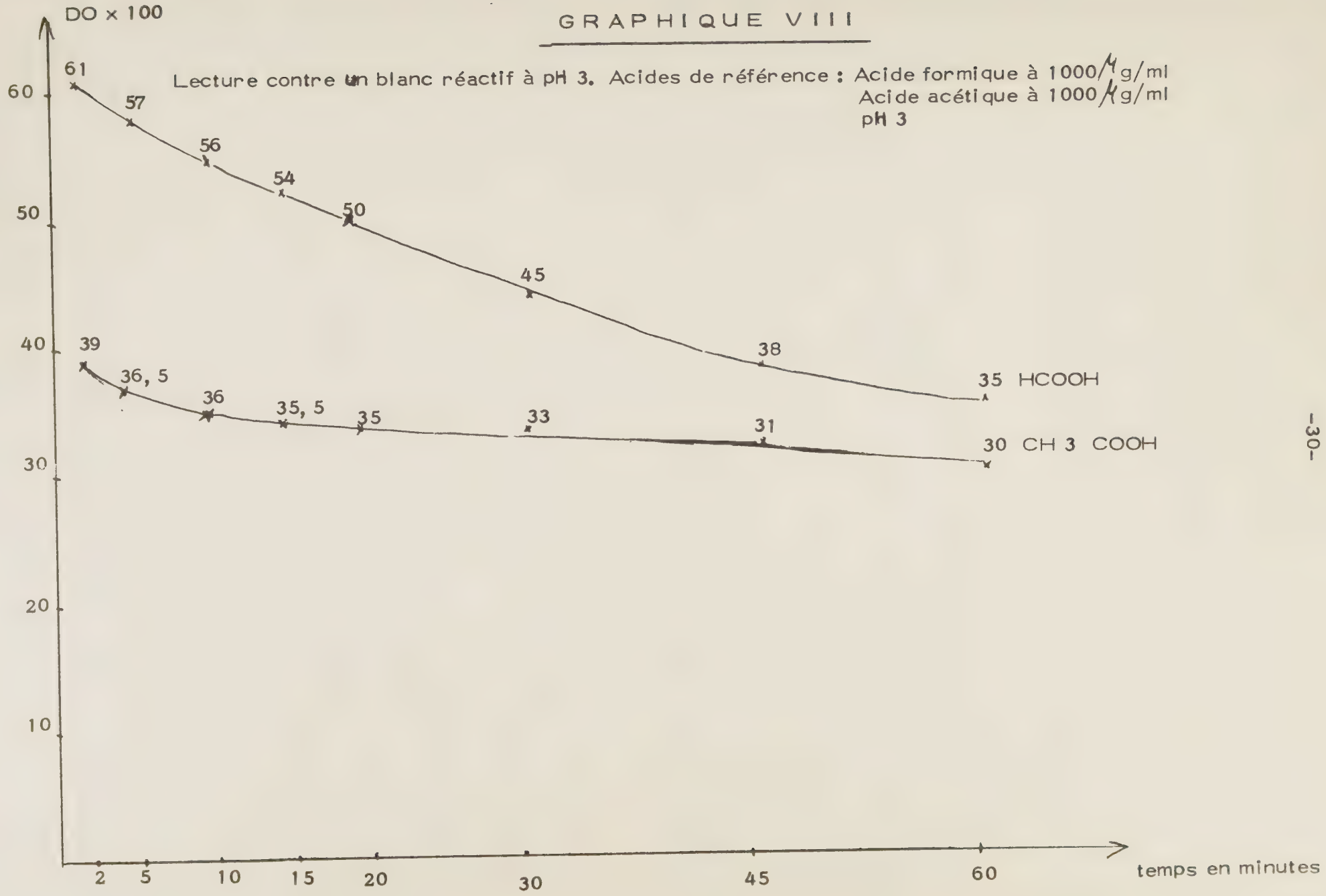


TABLEAU IX

Formules et poids moléculaires des acides de fermentation trouvés dans les selles.

Nom	Formule	Poids moléculaire
Ac. formique	H-COOH	46, 03
Ac. acétique	CH 3-COOH	60, 05
Ac. propionique	CH 3-CH2-COOH	74, 08
Ac. butyrique	CH 3-CH2-CH 2-COOH	88, 11
Ac. valérique	CH3-CH2-CH2-CH2-COOH	102, 13
Ac. lactique	CH 3-CHOH -COOH	90, 08
Ac. succinique	COOH-CH2-CH2-COOH	118, 09
Ac. fumarique	COOH-CH=CH-COOH	116, 07
Ac. malique	COOH-CHOH-CH2-COOH	134, 09

TABLEAU X

Correspondance des titres de solution acide en µg/0, 5 ml

Titre Nom et normalité	N/250	N/150	N/100	N/50	N/30	N/10
Ac. formique 46 g °/oo	92	153	230	460	765	2300
Ac. acétique 60 g‰	120	200	300	600	1000	3000
Ac. propionique 74 g‰	148	247	370	740	1233	3700
Ac. butyrique 88 g‰	176	293	440	880	1467	4400
Ac. valérique 102g‰	204	340	510	1020	1700	5100
Ac. lactique 90 g‰	180	300	450	900	1500	4500
Ac. succinique 59 g‰	118	197	295	590	983	2950
Ac. fumarique 58g‰	116	193	290	580	967	2900
Ac. malique 67g‰	134	223	335	670	1117	3350

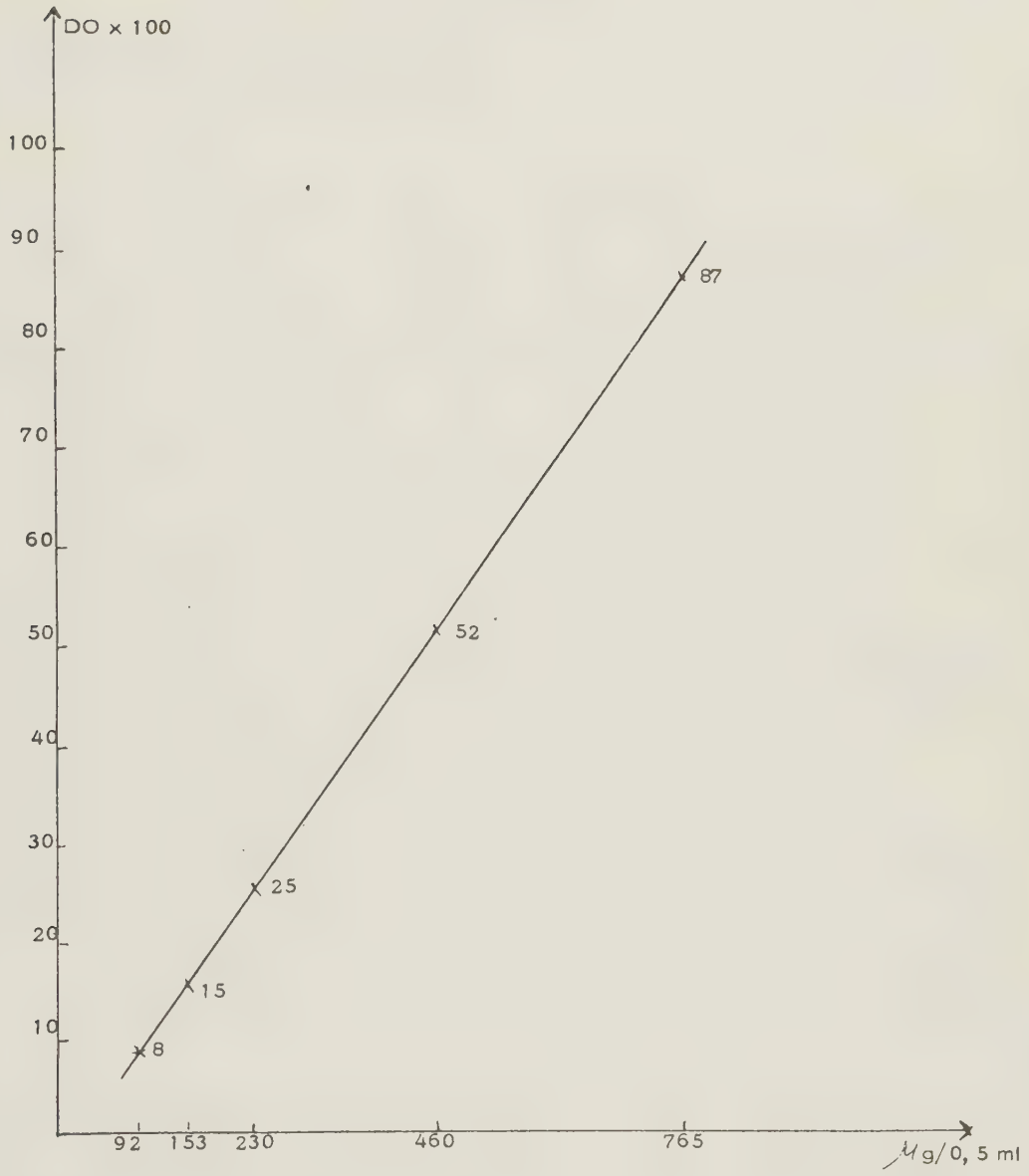
TABLEAU XI

Densités optiques obtenues pour différents titres d'acides (DO x 100)

Titre Nom	N/250	N/150	N/100	N/50	N/30	N/10
Ac. formique	8	15	25	52	87	> 100
Ac. acétique	8	13	20	40	66	> 100
Ac. propionique	< 8	8	12, 5	28	48, 5	> 100
Ac. butyrique	< 8	8	12, 5	27	48	> 100
Ac. valérique	< 8	< 8	< 8	8	15	49
Ac. lactique	< 8	12, 5	23	50	89, 5	> 100
Ac. succinique	< 8	11	17	40, 5	70	> 100
Ac. fumarique	< 8	< 8	< 8	11	21, 5	75
Ac. malique	12	19	29, 5	62	> 100	> 100

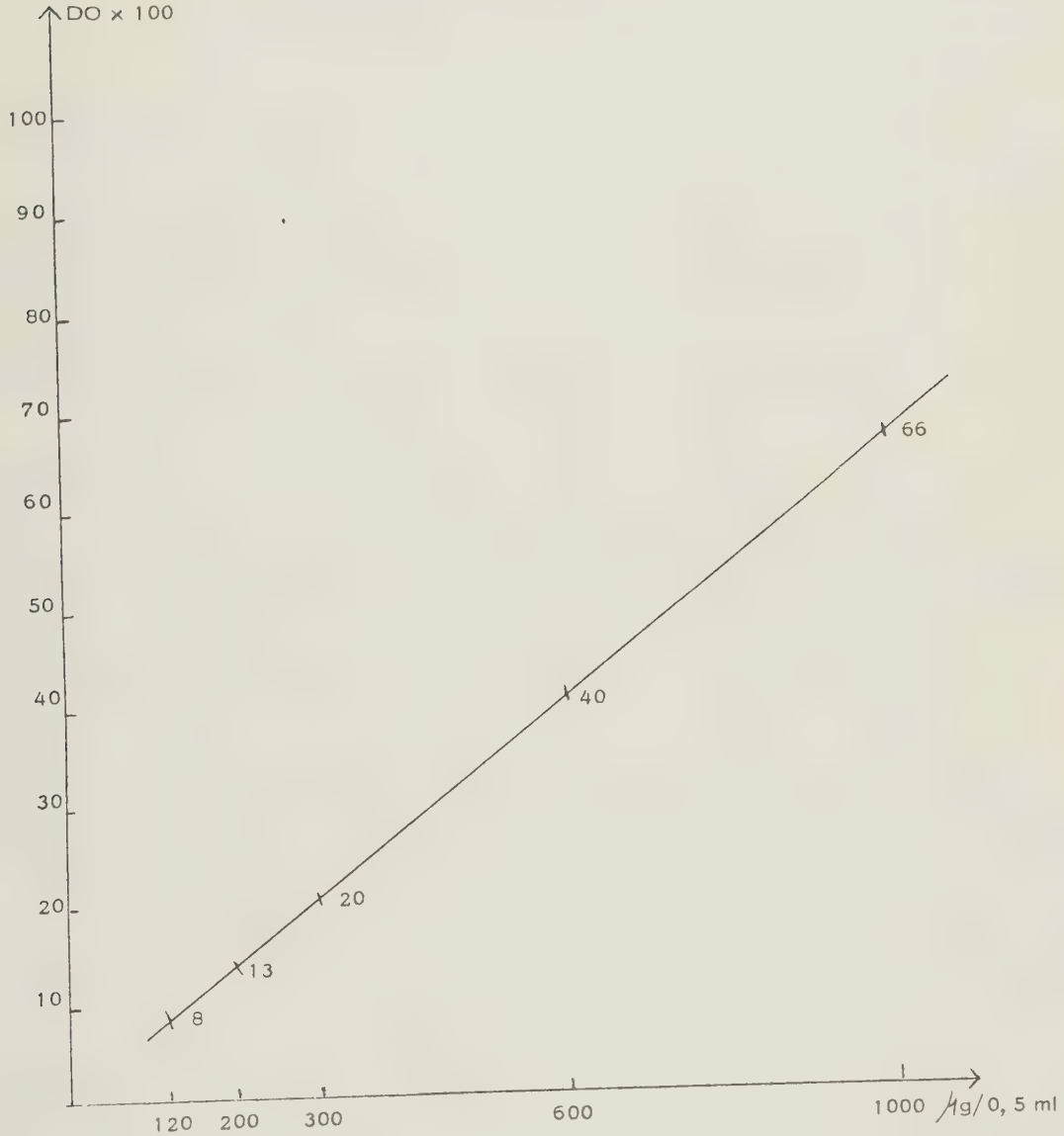
GRAPHIQUE IX

Dosage de l'acide formique



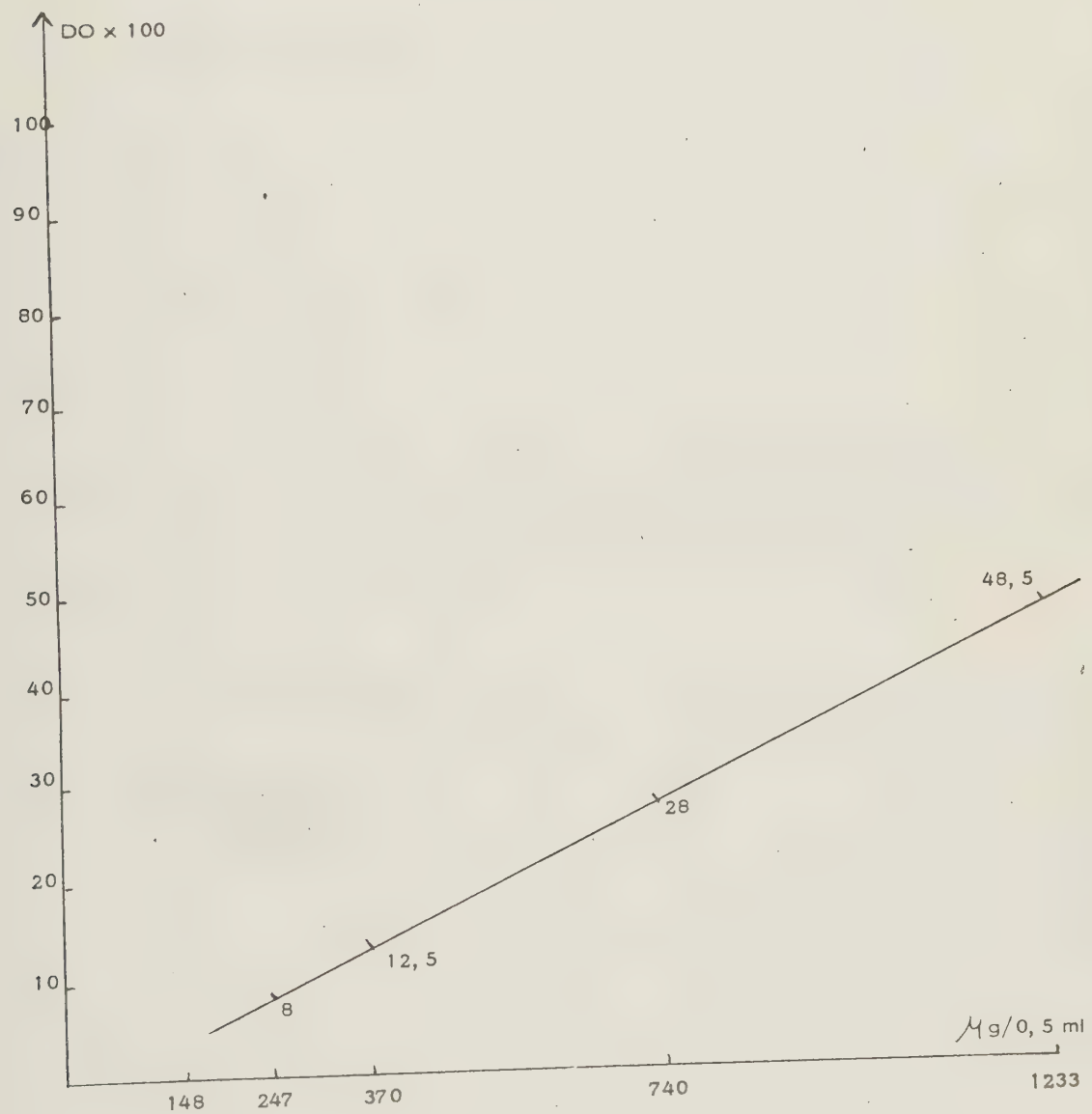
GRAPHIQUE X

Dosage de l'acide acétique



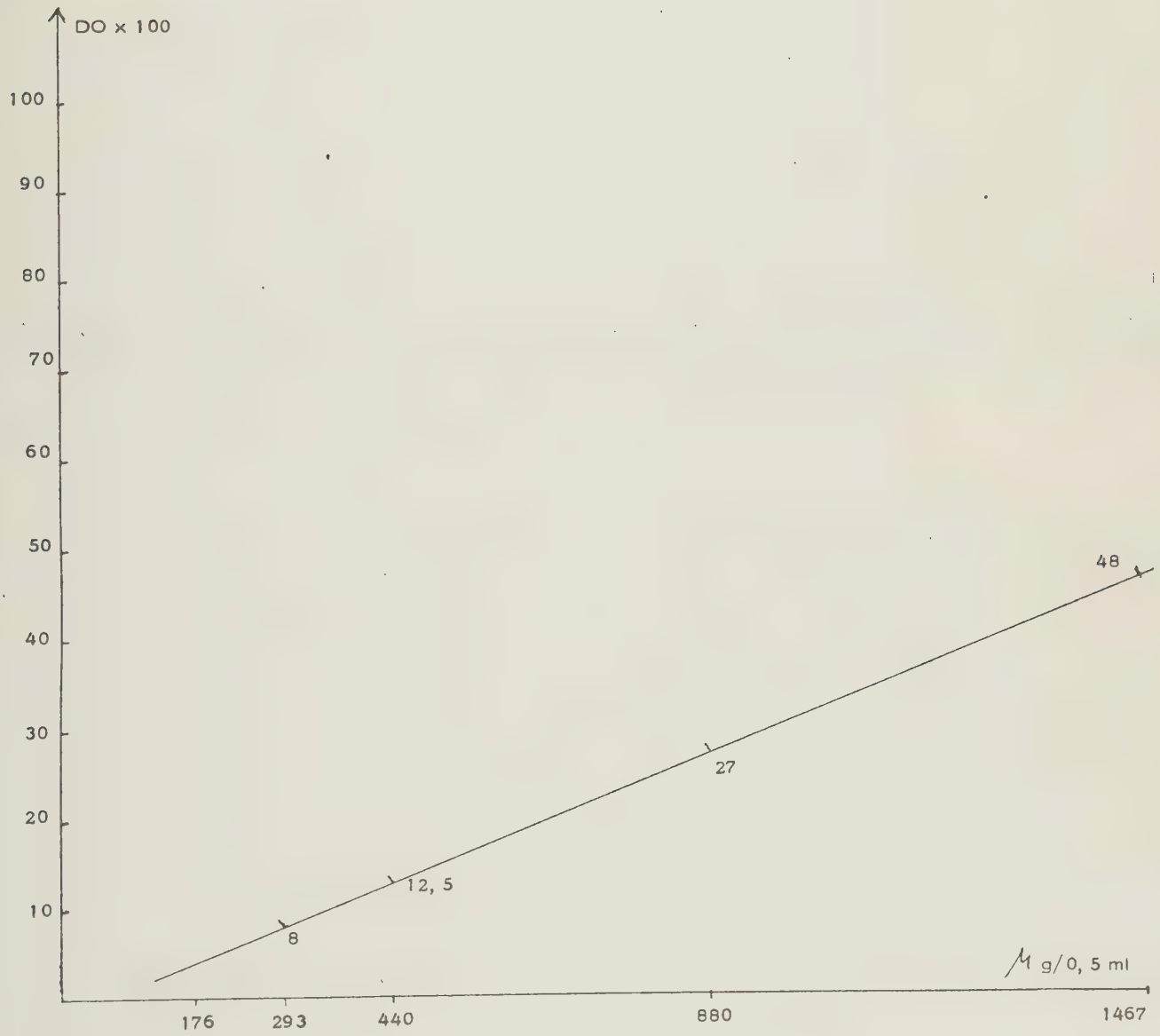
GRAPHIQUE XI

Dosage de l'acide propionique



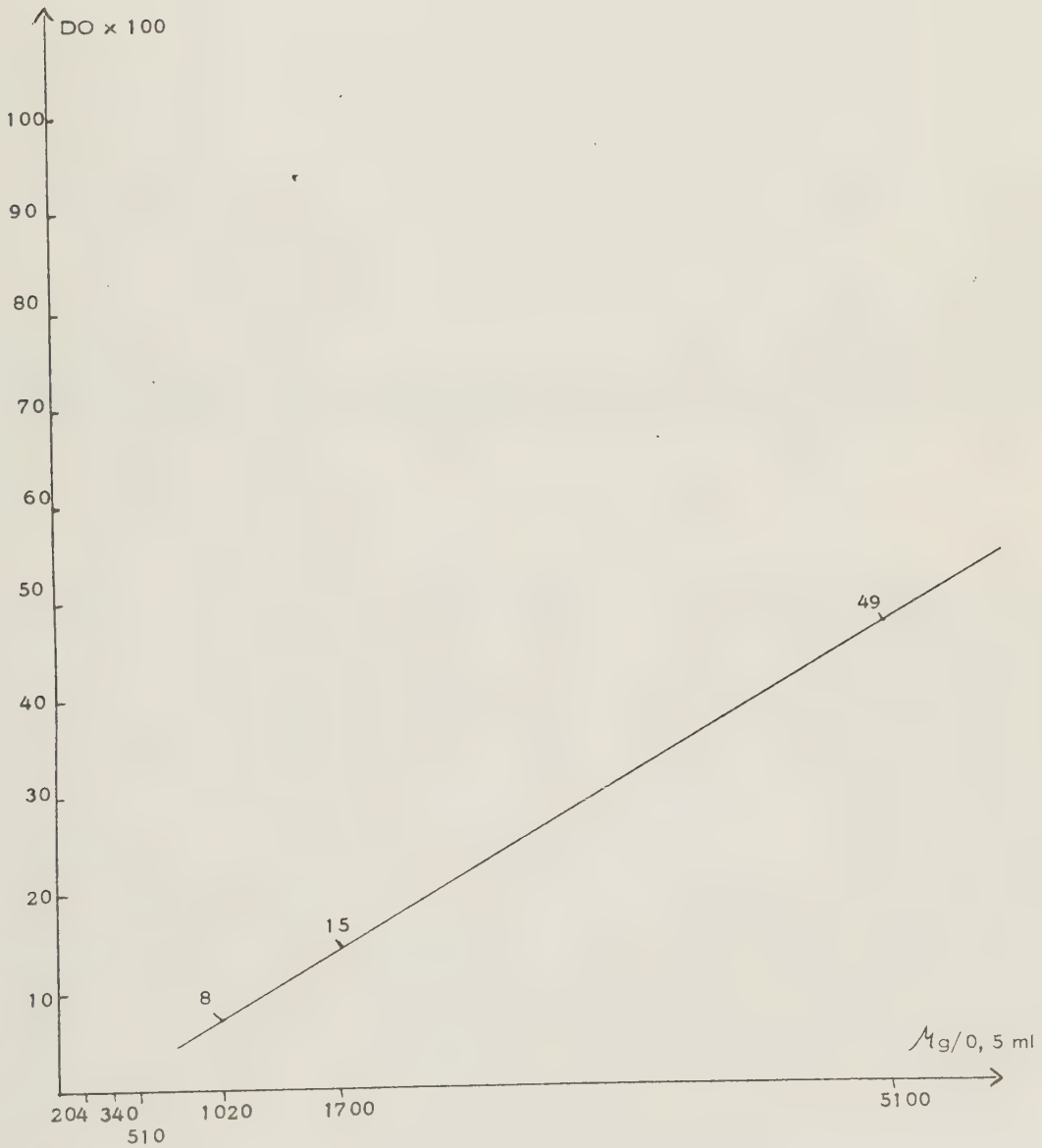
GRAPHIQUE XII

Dosage de l'acide butyrique



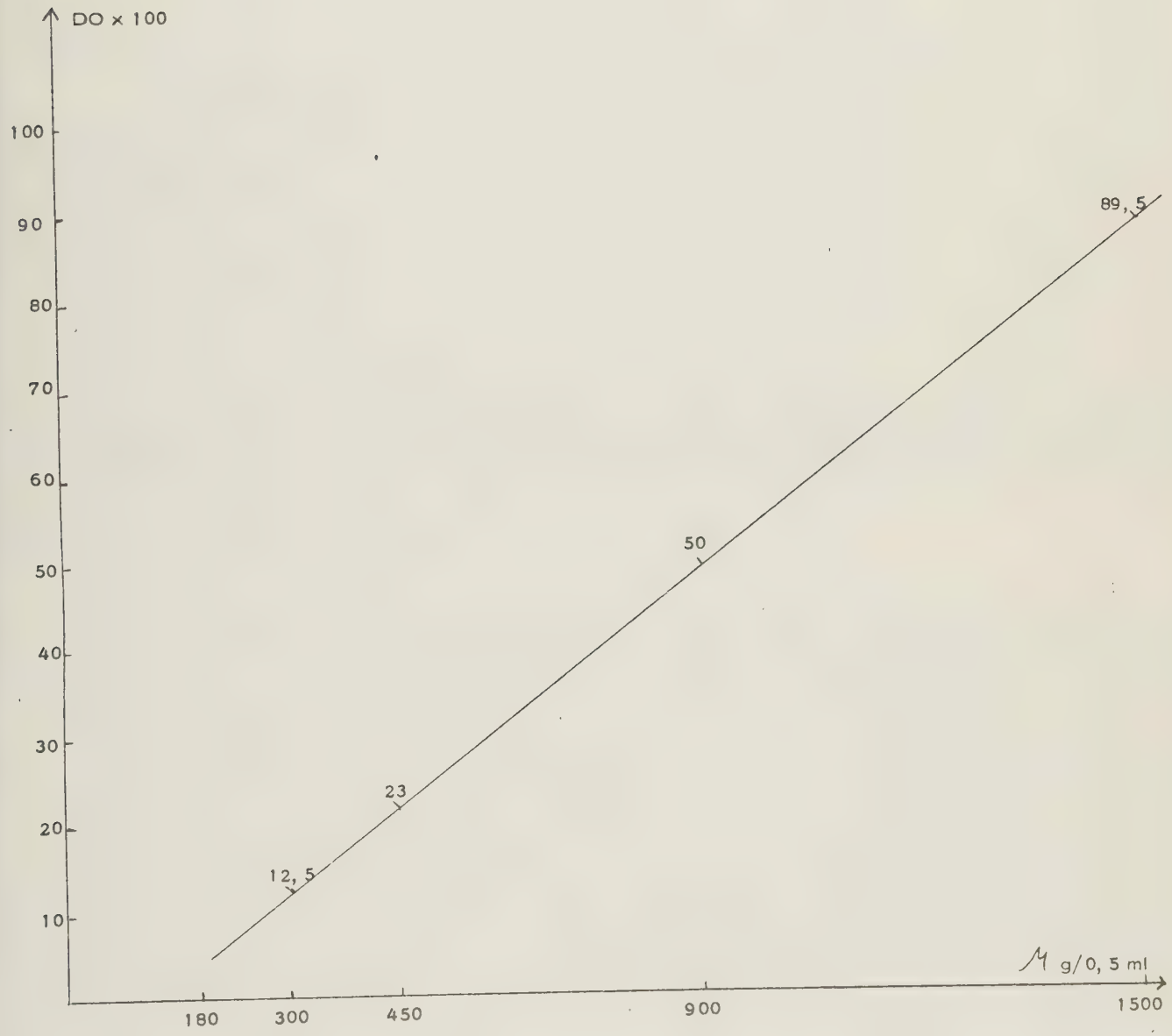
GRAPHIQUE XIII

Dosage de l'acide valérique



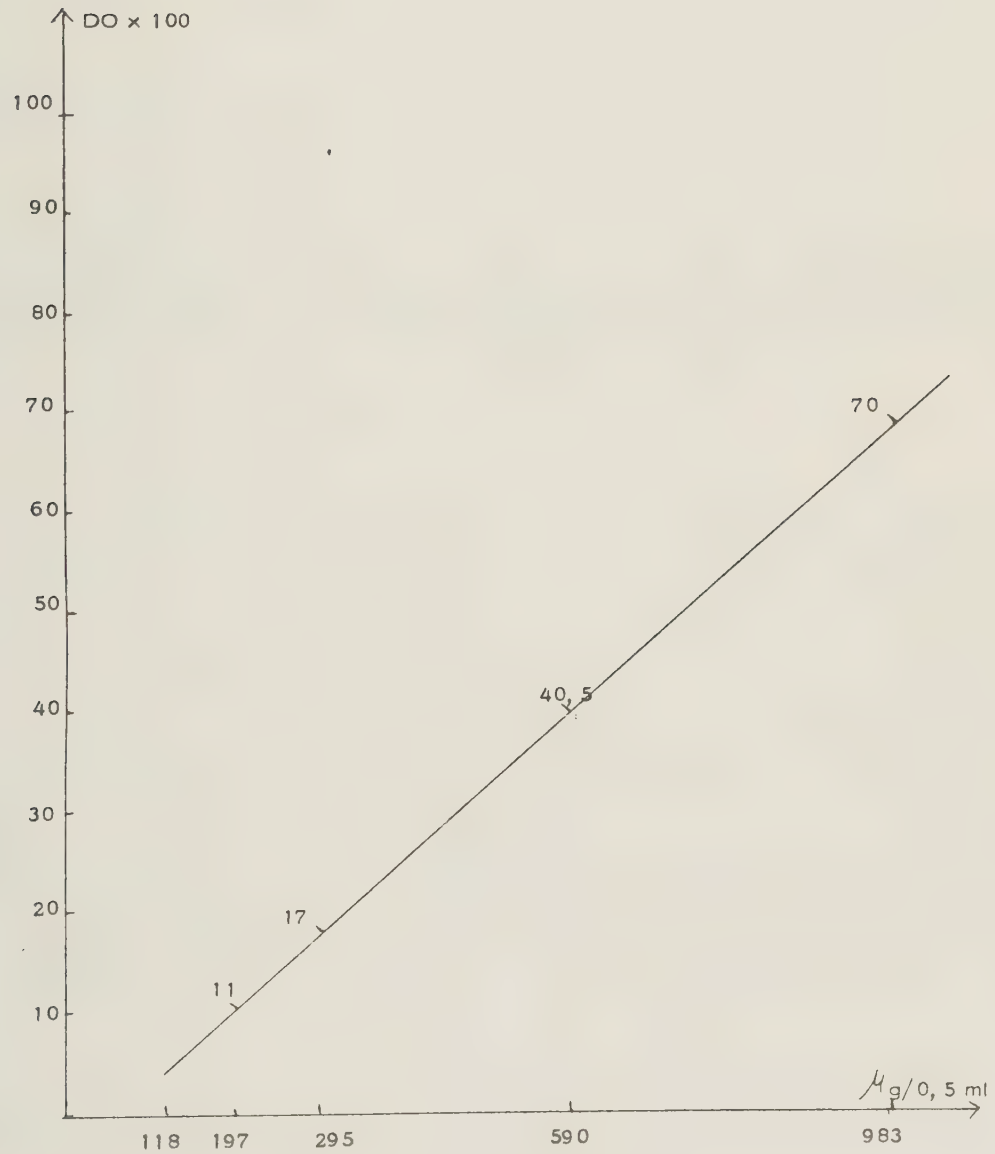
GRAPHIQUE XIV

Dosage de l'acide lactique



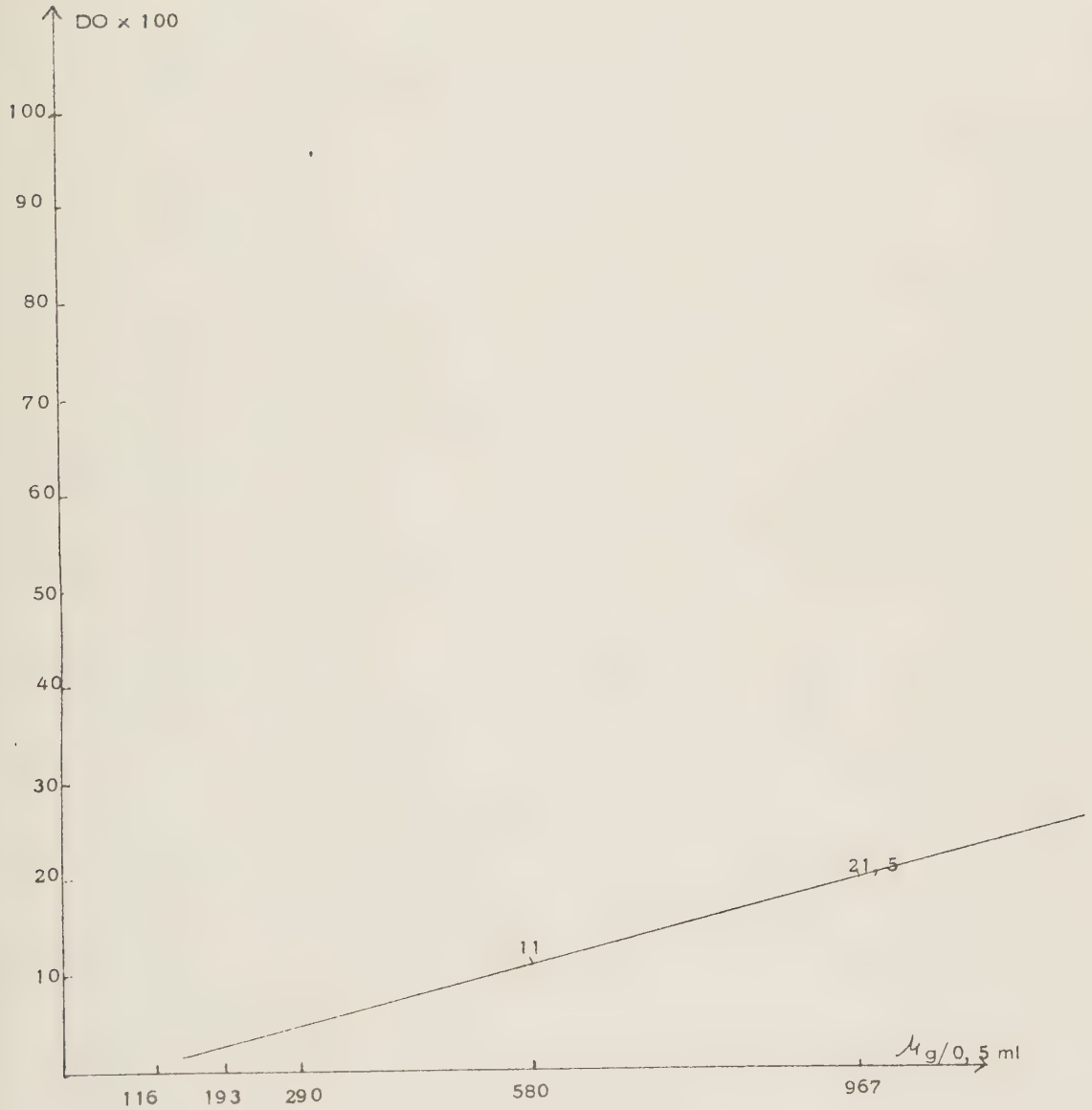
GRAPHIQUE XV

Dosage de l'acide succinique



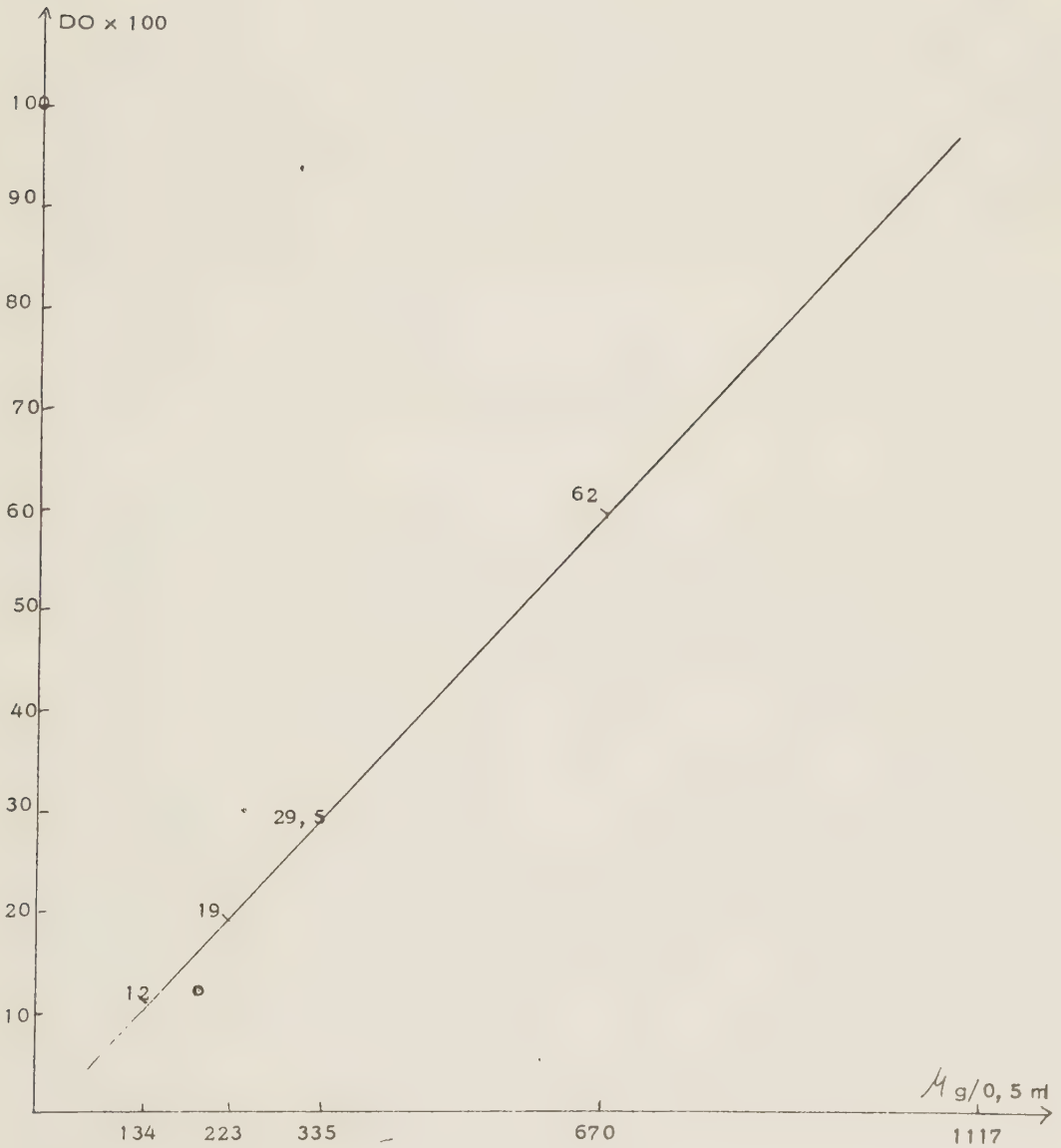
GRAPHIQUE XVI

Dosage de l'acide fumarique



GRAPHIQUE XVII

Dosage de l'acide malique



Toutes les représentations graphiques obtenues sont des droites ; par conséquent chaque acide donne une réaction quantitative, en présence de réactif N N', et dans les conditions ci-dessus. Ceci est important pour l'application au dosage biologique. En effet, nous doserons en bloc l'acidité contenue dans un certain volume de selles et nous exprimerons les résultats en fonction d'un acide de référence : l'acide acétique, en nous reportant au graphique X.

D - SENSIBILITE

Les facteurs augmentant la reproductibilité de la réaction ont également amélioré sa sensibilité. D'après le graphique X, le seuil est de 120 µg ($\frac{N}{250}$) pour l'acide acétique au lieu de 200 µg dans la technique initiale non codifiée de PESEZ (graphique I). Une densité optique moyenne de 0,40 est obtenue en dosant une solution d'acide acétique $\frac{N}{50}$ soit 600 µg. D'après PESEZ, 800 µg étaient nécessaires (graphique I). Le temps de lecture de 5 minutes expliquerait en partie cette sensibilisation. Si nous nous plaçons dans les conditions de l'analyse biologique à laquelle nous désirons appliquer cette technique quantitative, il faudrait que la densité optique donnée par la solution préparée à partir d'une selle contenant une quantité physiologique d'acides organiques se situe dans cette zone optimum de 0,40. Nous devons donc vérifier si la sensibilité de la technique ainsi décrite permet son application aux selles et dans une éventualité défavorable essayer d'y remédier.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

III - APPLICATION A L'ANALYSE FECALE

La technique proposée est appliquée au dosage des acides organiques contenus dans les selles.
Elle doit tenir compte de tous les acides ayant un intérêt physio-pathologique c'est-à-dire des acides de fermentation.
La préparation de la selle consiste à obtenir un liquide limpide au pH optimum retenu pour une réaction colorée aussi sensible que possible.
Nous introduisons donc trois éléments indispensables à l'élaboration d'une technique applicable à l'analyse fécale :

- le pH optimum
- la clarification de la selle
- la dilution de la selle.

Le pH sera testé au cours de différents dosages, sur des liquides limpides obtenus après la méthode de clarification décrite par GOIFFON. Nous étudierons ensuite différents procédés de clarification diluant la selle au minimum. Nous jouerons ensuite sur la dilution finale de la selle pour obtenir la meilleure sensibilité lors du dosage.
En fonction des résultats nous mettrons au point un protocole opératoire applicable à l'analyse biologique.

A - pH

Nous adoptons pour cet essai, la clarification proposée par GOIFFON et NEPVEUX (1) : la selle est diluée au $\frac{1}{10}$ avec de l'eau distillée, clarifiée par le perchlorure de fer et la chaux hydratée puis filtrée.
Le filtrat est jaune clair, limpide ; il constitue le liquide biologique qui servira au dosage.
Nous appliquons à 2 selles (1 et 2) la réaction de PESEZ en opérant à 3 pH différents : 3. 2. 1. ajustés très précisément.
En conséquence pour amener le liquide biologique au pH désiré, nous sommes obligés de poursuivre la dilution jusqu'au $\frac{1}{20}$. Nous procédons ainsi : prélever 5 ml de liquide à doser correspondant à une dilution fécale au $\frac{1}{10}$; ajuster au pH choisi avec de l'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$ et compléter à 10 ml avec de l'eau distillée (dilution finale au $\frac{1}{20}$). A 0, 5 ml de prise d'essai, ajouter 1 ml de réactif N N' à 1 %. Attendre 15 minutes avant d'ajouter 1 ml de réactif hydroxylamine-soude. Après 15 minutes verser 10 ml de réactif au perchlorate ferrique et noter les densités optiques en fonction du temps, le zéro du spectrophotomètre étant fait avec le blanc réactif correspondant à chaque pH.
Le pH 3, seul, permet d'obtenir une réaction mesurable.
A pH 1 et pH 2, les densités optiques sont pratiquement nulles.
Dans le tableau suivant nous groupons les résultats à pH 3 (DO x 100) pour les selles 1 et 2 :

temps en minutes selle	2	5	10	15	20	30	45	60
1	14, 5	13, 5	13	12, 5	12	10, 5	9, 5	8, 5
2	12, 5	12	11, 5	11	11	10, 5	9, 5	8, 5

Le graphique XVIII montre que la coloration obtenue diminue faiblement et très progressivement.
La réaction est possible mais ne donne qu'une faible densité optique dans les conditions décrites. On ne note pas de précipitation au cours des différents stades.
Cet essai préliminaire positif nous permet d'envisager une application à l'analyse fécale au pH3. Les deux selles 1 et 2 sont normales du point de vue de leur teneur en acides organiques (méthode de BAILENGER : 17 ml et 15 ml). Les densités optiques qu'elles donnent sont nettement inférieures à 0, 40.
La sensibilisation de la réaction de PESEZ est donc indispensable pour doser le faible taux d'acides organiques présents dans les selles. Nous pouvons jouer tout d'abord sur la dilution de la selle lors de la clarification.

B - CLARIFICATION DE LA SELLE

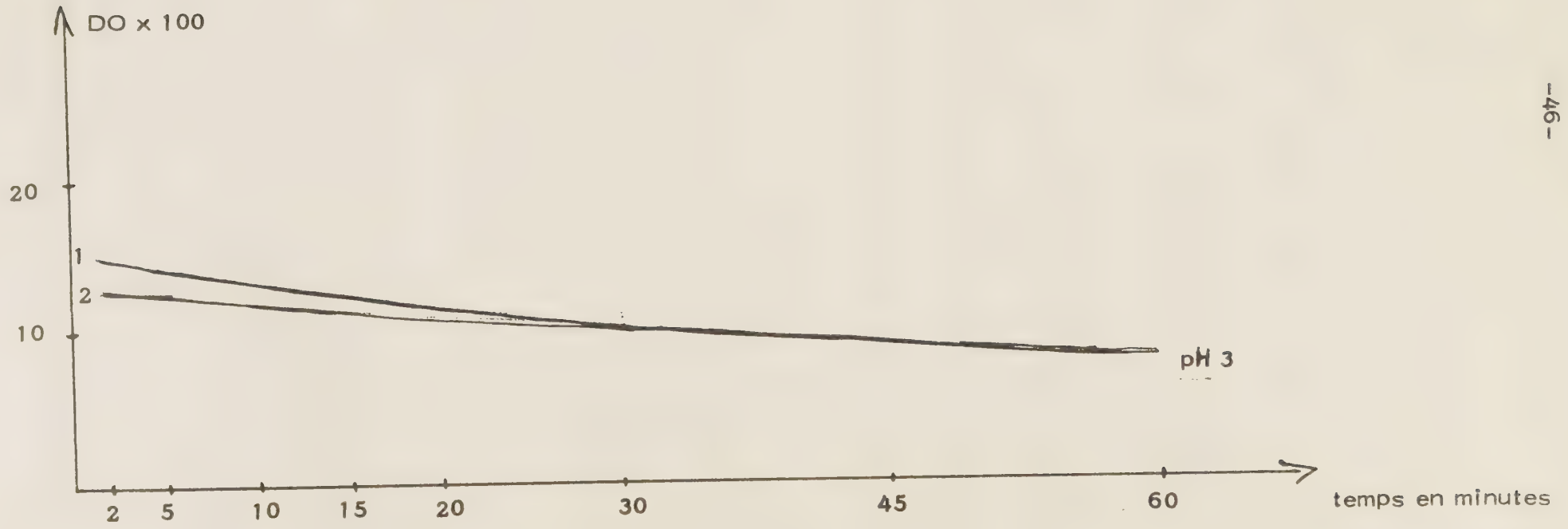
La réaction étant possible mais faible, nous cherchons donc une méthode de clarification aboutissant à une dilution moins poussée que précédemment c'est-à-dire inférieure au $\frac{1}{20}$ après ajustage à pH3.
La selle est d'abord diluée au $\frac{1}{5}$ (10 g de selles dans 50 ml d'eau distillée) en opérant dans un verre à pied et en se servant d'un agitateur.
C'est cette suspension que nous devons éclaircir avant de doser les acides organiques qui y sont contenus.

1° - Méthodes proposées

Les critères d'éfficacité sont les suivants :
. limpidité du liquide destiné au dosage ; il s'agit en effet d'une méthode photométrique
. maintien de la dilution faible de la selle : $\frac{1}{5}$
. absence de précipitation au cours de réaction
. élimination des acides susceptibles de gêner : ac. phosphorique, ac. oxalique
. absence d'absorption ou d'interférence du réactif clarifiant.
Les méthodes ci-dessous vont essayer de répondre à ces critères :
. centrifugation suivie ou non de filtration
. filtration acide :
- acide chlorhydrique
- acide phosphotungstique-chlorhydrique

GRAPHIQUE XVIII

Courbe DO = f (t) à pH 3 lors du dosage de 2 selles 1 et 2 (dilution finale = 1/20)



. filtration alcaline :
- soude
- chaux

a) Centrifugation

Mettons dans un tube à centrifuger 10 à 15 ml de suspension de selle au $\frac{1}{5}$. Après centrifugation, 5 minutes à 3000 tours/mn, le surnageant n'est pas limpide : seuls sont éliminés les gros déchets qui sédimentent au fond du tube.
Amenons 5 ml de surnageant à pH 3 avec de l'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$ avant de compléter à 10 ml avec de l'eau distillée. La dilution finale est donc au $\frac{1}{10}$. Le dosage éffectué selon la technique de PESEZ donne une densité optique de 0, 22 lue au bout de 5 minutes contre le blanc réactif.
Le surnageant trouble peut être filtré tout de suite après la centrifugation, mais même dans ce cas le liquide obtenu n'est pas clair.
Nous en prélevons 5 ml et complétons à 10 ml après ajustage à pH 3.
La densité optique obtenue après le dosage de PESEZ, lue au bout de 5 minutes contre le blanc réactif est de 0, 23.
Dans ces deux cas, nous avons dû filtrer la solution colorée avant de mesurer sa densité optique à cause du trouble persistant pendant toute la réaction.
Donc cette technique ne satisfait pas au critère de limpidité à la dilution $\frac{1}{5}$.

b) Filtration acide

α) Acide chlorhydrique

La dilution aqueuse au $\frac{1}{5}$ des selles est centrifugée ; 5 ml de surnageant sont amenés à pH3 par l'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$, complétés à 10 ml avec de l'eau distillée et laissés au repos. Au bout d'une heure, il se dépose un précipité assez important, comme si certains composés devenaient insolubles en milieu acide.
Le filtrat que nous obtenons n'est pas cependant encore limpide. La solution colorée que donne la réaction doit être également filtrée avant de mesurer sa densité optique égale à 0, 20.

β) Acide phosphotungstique-chlorhydrique

. acide phosphotungstique 5, 50 g
. acide chlorhydrique 0,75 ml
. eau distillée qsp 250 ml

Ce réactif a un pH de 1, 5 et nous sert à amener à pH 3, 5ml de la suspension de selle au $\frac{1}{5}$ centrifugée.
Nous complétons à 10 ml. Après un repos d'une heure, le filtrat que nous obtenons est clair. Mais il se trouble très fortement après addition du réactif au perchlorate, rendant impossible la lecture de la densité optique même après filtration.
Ceci serait dû à la précipitation de l'acide phosphorique présent à une concentration importante dans le réactif, donc il y a une interférence gênante.

c) Filtration alcaline

α) Soude

Nous traitons 50 ml de dilution fécale au $\frac{1}{5}$ par 1 ml de perchlorure

de fer et 6 ml environ de soude N, ce qui amène le pH à 9. Après repos d'une heure, la filtration donne un liquide limpide.
Nous prélevons 5 ml de filtrat, que nous ajustons à pH 3 et complétons à 10 ml avant d'effectuer le dosage. La densité optique est alors de 0, 22
Cette méthode est à retenir en raison :
. de la limpidité obtenue
. de la faible dilution finale ($\frac{1}{10}$)
Mais elle présente de nombreux inconvénients :
. certaines selles consistantes filtrent difficilement et lentement et parfois même, après le repos d'une heure, la filtration est impossible. Ce fait peut s'expliquer par la solubilité de la plupart des sels de sodium d'acides présents dans les matières fécales : sulfates, phosphates, carbonates et oxalates qui ne participent pas à la défécation de la dilution des selles.
. cette solubilité a un autre inconvénient : les acides phosphorique et oxalique risquent de précipiter si leur concentration est supérieure à un certain seuil comme nous l'avons précédemment démontré avec une solution pure de ces acides. Pour vérifier l'éventualité de cet inconvénient avec la dilution fécale, 20 g de selles, sont soigneusement dilués dans 100 ml d'eau distillée. La suspension obtenue est divisée en deux fractions de 50 ml. A l'une d'elles on ajoute 0, 25 ml d'acide phosphorique pur de façon que sa concentration soit de 5000 µg/ml. Chaque fraction est clarifiée par 1 ml de perchlorure de fer et 6 ml de soude N, puis filtrée. Le dosage s'effectue dans chaque cas sur un liquide ajusté à pH3 et dilué au titre final du $\frac{1}{10}$. La fraction à laquelle il a été ajouté un excès d'acide phosphorique (concentration supplémentaire finale de 2500 µg/ml) se trouble lors du dosage, de sorte que la mesure de la densité optique est impossible.
La fraction n'ayant pas reçu l'acide phosphorique garde sa limpidité au cours de la réaction et la densité optique est de 0, 22.
Ainsi l'emploi de la soude pour la clarification présente deux inconvénients :
. efficacité inconstante
. précipitation ultérieure possible.

β) Chaux
Au lieu d'alcaliniser la dilution fécale au $\frac{1}{5}$ par 6 ml de soude N, nous ajoutons, comme dans la technique de GOIFFON, une pincée de chaux hydratée.
Après un repos de 5 minutes, nous filtrons et nous obtenons un liquide très clair dont le pH est supérieur à 12 ; 5 ml sont ajustés à pH 3 et complétés à 10 ml.
Le dosage aboutit à une densité optique de 0, 23.
Cette méthode a les mêmes avantages que précédemment :
. limpidité du liquide obtenu
. faible dilution finale ($\frac{1}{10}$), mais n'en présente pas les inconvénients en effet :
. la filtration est rapide après 5 minutes de repos seulement quelle que soit la consistance fécale, ce qui peut s'expliquer par la précipitation des sels de calcium formés qui facilitent la défécation de la dilution.

. les acides phosphorique et oxalique quelle que soit leur concentration sont insolubilisés sous forme de phosphate et d'oxalate de chaux et sont donc éliminés du filtrat.

Le risque de précipitation lors du dosage est systématiquement écarté. Pour le montrer, on refait l'expérience précédente concernant l'influence de la concentration en acide phosphorique sur la précipitation du liquide à doser, en remplaçant la soude par une pincée de chaux hydratée : 20 g de selles sont soigneusement dilués dans 100 ml d'eau distillée. La suspension obtenue est divisée en deux fractions de 50 ml. A l'une d'elles on ajoute 0, 25 ml d'acide phosphorique pur amenant une concentration supplémentaire de 5000 µg/ml.

Chaque fraction est clarifiée par 1 ml de perchlorure de fer et une pincée de chaux hydratée puis filtrée et ajustée à pH3. On dilue au titre final du $\frac{1}{10}$. On dose. La fraction à laquelle il a été ajouté un excès d'acide phosphorique ne se trouble pas lors du dosage et la densité optique obtenue est égale à celle donnée par l'autre fraction : 0, 23.

L'acide phosphorique quelle que soit sa concentration a été précipité à l'état de phosphate et éliminé.

L'emploi de la chaux semble valable au point de vue efficacité et limpidité mais il nous reste à envisager une absorption éventuelle sur la chaux ou l'interférence d'un des réactifs employé dans la réaction.

Partons de 100 ml d'une solution d'acide acétique à 1000 µg/ml

A 50 ml ajoutons 1 ml de perchlorure de fer et une pincée de chaux hydratée. Filtrons. Aux 50 ml restant ajoutons uniquement une pincée de chaux hydratée. Filtrons. 5 ml de chaque filtrat sont ajustés à pH3 et complétés à 10 ml. La solution de comparaison est donc une solution d'acide acétique à 500 µg/ml. Nous effectuons un blanc réactif.

Les densités optiques obtenues à partir des deux dosages et de la solution acétique sont identiques et égales à 0, 18.

On en déduit qu'il n'y a aucune absorption des acides organiques sur la chaux et aucune interférence du perchlorure de fer qui aurait pu compenser éventuellement l'absorption.

2° - Conclusion

Le tableau XII résume les résultats obtenus par chaque méthode d'éclaircissement sur une selle diluée au $\frac{1}{5}$.

La méthode de filtration alcaline inspirée de celle de GOIFFON, est celle que nous choisissons car elle répond à tous nos critères d'efficacité :

- filtration rapide
- limpidité à cette dilution
- absence de précipitation ultérieure
- élimination des acides susceptibles de gêner
- absence d'absorption ou d'interférence des réactifs.

C - MODIFICATION DE LA DILUTION FINALE

Le point de départ est constitué par les 5 ml de filtrat au $\frac{1}{5}$. L'ajustage à pH 3 nécessite l'addition d'un certain volume d'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$ Avec un titre $\frac{N}{5}$ nous n'utilisons que 0, 6 ml environ. Il est possible d'employer l'acide à un titre inférieur, soit qui fera varier le pH plus progressivement et permettra d'atteindre ainsi une dilution plus précise.

TABLEAU XII

Valeur des différentes méthodes d'éclaircissement des selles

Méthode	Limpidité	Caractère de la filtration	Précipitation ultérieure	DO x 100
(1)	-		+	22
(2)	-	lente	+	23
(3)	-	lente	+	20
(4)	+	lente	+++	(trouble)
(5)	(+)	rapide mais parfois impossible	(+)	22
(6)	+	rapide	élimination des acides phosphorique et oxalique	23

(1) centrifugation
(2) centrifugation suivie de filtration
(3) filtration acide (ac. chlorhydrique)
(4) filtration acide (ac. phosphotungstique -chlorhydrique)
(5) filtration alcaline (soude)
(6) filtration alcaline (chaux) = méthode de GOIFFON

L'expérience montre qu'il faut 1, 5 à 2 ml de cette solution titrée pour amener le pH à 3.
Par conséquent, après cet ajustage, nous pouvons compléter à 7, 5 ml au lieu de 10 ml, et nous obtenons une dilution finale au $\frac{1}{7,5}$ qui reste encore très limpide.
Prenons 5 selles : 3. 4. 5. 6. 7. Chaque selle est diluée au $\frac{1}{5}$ puis éclaircie par la méthode précédente. Après ajustage à pH3, nous poursuivons les dilutions au $\frac{1}{7,5}$ et au $\frac{1}{10}$ de façon à comparer les résultats des dosages.
Le tableau suivant indiquant les densités optiques (DO x 100) obtenues, nous montre l'avantage d'une dilution moins poussée :

Selles	dilution 1/10	dilution 1/7, 5
3	24	27
4	18	20
5	29	33
6	39	44
7	21	25

D - PROPOSITION D'UNE TECHNIQUE

1° - Mode opératoire

Diluer 10 g de selles dans 50 ml d'eau distillée. Ajouter 1 ml de perchlorure de fer (soluté officinal). Bien mélanger avant de verser une pincée de chaux hydratée. Agiter.
Laisser au repos cinq minutes. Filtrer. Le filtrat obtenu est jaune clair et limpide.
5 ml sont ajustés au pH-mètre à pH 3 par de l'acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$ dont on note le volume ajouté.
Nous pouvons alors compléter à 7, 5 ml avec de l'eau distillée. Ce liquide par rapport à la selle initiale est dilué au 1/7, 5. 0, 5 ml de chaque dilution est ensuite dosé selon la méthode de PESEZ à pH 3

2° - Expression des résultats

Cette réaction effectuée sur les 5 selles : 3. 4. 5. 6. 7. conduit, du fait de la dilution finale au $\frac{1}{7,5}$ au lieu de $\frac{1}{20}$, à des densités optiques beaucoup plus élevées que dans notre essai préliminaire.
En effet, disposons les résultats sous forme d'un tableau en les comparant à titre indicatif à ceux obtenus par la méthode de BAILENGER :

Selles	Densité optique (DO x 100)	Méth ode de BAILENGER (ml)
3	27	19
4	20	14
5	33	22
6	44	28
7	25	15, 5

Nous avons un échantillonnage assez complet de selles de teneurs en acides organiques variées.
La référence à la méthode de BAILENGER nous permet seulement de savoir si la selle dosée est d'acidité normale, faible ou élevée.
La selle 6 (densité optique de 0, 44) est très riche en acides organiques (méthode de BAILENGER : 28 ml). La selle 7 donnant une densité optique faible (0, 25) a une acidité normale (méthode de BAILENGER : 15, 5 ml).
La sensibilité de la réaction doit donc être augmentée pour que la densité optique traduisant l'acidité d'une selle normale atteigne une valeur voisine de 0, 40.
En nous reportant à un graphique de référence, nous pourrons lire à partir de la densité optique le nombre de µg d'acide de référence qui donnent le même résultat. Cette quantité est donc contenue dans les 0, 5 ml de la dilution fécale au $\frac{1}{7,5}$ c'est à dire dans $\frac{1}{15}$ g de selle.
Pour rapporter les résultats à 100 g de selle, il faut utiliser un coefficient de 1500.
Le choix de l'acide de référence intervient à ce stade-là. Son poids moléculaire nous permettra de rendre les résultats en nombre de ml de solution N d'acide contenus dans 100 g de selle.
Les expérimentations des derniers chapitres nous conduisent à choisir l'acide acétique étant donné :
. son importance dans les selles
. son dosage satisfaisant par la méthode de PESEZ
. son emploi au laboratoire plus répandu que celui de l'acide formique.
Le graphique X nous donne le nombre de µg correspondant à la densité optique (par exemple, pour la selle 7 normale : 360 µg pour 0, 25) et le coefficient devient $\frac{1500}{60000}$ soit $\frac{1}{40}$
Ceci nous montre que l'acidité normale d'une selle équivaut à 9 ml d'acide acétique N dans 100 g de la selle. La densité optique n'est que de 0, 25.
Nous allons donc dans les chapitres ultérieurs sensibiliser la technique de PESEZ en la modifiant.

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUE DE PESEZ MODIFIEE

I - MODIFICATIONS DE LA REACTION DE PESEZ

Dans l'étude expérimentale analytique de la réaction de PESEZ, nous avons défini les différents facteurs susceptibles d'améliorer la réaction du point de vue de la reproductibilité.
Dans les conditions de l'analyse biologique à laquelle nous désirons appliquer cette technique, c'est-à-dire une bonne sensibilité, nous allons modifier la réaction en jouant sur les facteurs suivants :

- volume des réactifs
- longueur d'onde
- température
- temps d'action des réactifs.

A - VOLUME DES REACTIFS

Les proportions définies par PESEZ sont les suivantes :

- prise d'essai 0, 5 ml
- réactif N N' à 1 % 1 ml
- réactif hydroxylamine-soude 10 ml

Nous allons intervenir en modifiant les volumes :

1° - du réactif au perchlorate
2° - de la prise d'essai, et en conséquence :
  a) le volume et la concentration du réactif N N'
  b) le volume du réactif hydroxylamine-soude.

1° - Réactif au perchlorate

a) Essai d'orientation
On part d'une solution d'acide acétique $\frac{N}{100}$ ajustée à pH3.
La réaction est effectuée sur une prise d'essai de 0, 5 ml mais avec un volume variable de réactif au perchlorate : 5. 6. 8. et 10 ml.
La proportion des autres réactifs est inchangée. On lit au bout de 5 minutes contre un blanc réactif pour chaque épreuve.
. 5 ml : on note une floculation aussi bien dans le tube témoin que dans le tube épreuve.
. pour les volumes supérieurs, aucune floculation n'est visible : on note des densités optiques de 0, 21 pour 6 ml, 0, 20 pour 8 ml et 0, 19 pour 10 ml.
La réduction du volume de perchlorate sensibilise artificiellement la réaction : il n'est toutefois pas possible de réduire ce volume à moins de 6 ml.
Cependant la stabilité de la coloration en fonction du temps semble varier par suite de la modification du volume.

b) Stabilité en fonction du temps
On dose trois solutions à pH3 :
. acide formique $\frac{N}{50}$
. acide acétique $\frac{N}{50}$
. acide acétique $\frac{N}{100}$

TABLEAU XIII

Décroissance de la densité optique en fonction du temps en opérant sur une solution d'acide formique $\frac{N}{50}$ avec différents volumes de réactif au perchlorate (DO x 100)

temps (mn) volume (ml)	2	5	10	15	20	30	45	60
6	61	59, 5	58	57	56	52	48	45
7	64	57	50	45	40	34	28, 5	25
8	59	55	48	44, 5	42	39	33	30
9	57	55	52, 5	50	47	43, 5	37	34
10	56	53	50	48	45, 5	43	37	34

TABLEAU XIV

Décroissance de la densité optique en fonction du temps en opérant sur une solution d'acide acétique $\frac{N}{50}$ avec différents volumes de réactif au perchlorate (DO x 100)

temps (mn) volume (ml)	2	5	10	15	20	30	45	60
6	51, 5	47, 5	46, 5	45, 5	45	43, 5	41	39, 5
7	56	52	48	46	43	40	36	30
8	44, 5	42, 5	39, 5	38, 5	37, 5	36	33, 5	32, 5
9	42, 5	41, 5	38, 5	37, 5	36	34	33, 5	32, 5
10	41, 5	41	38, 5	38	36, 5	34, 5	34	33

TABLEAU XV

Décroissance de la densité optique en fonction du temps en opérant sur une solution d'acide acétique $\frac{N}{100}$ avec différents volumes de réactif au perchlorate.
(DO x 100)

temps (mn) volume (ml)	2	5	10	15	20	30	45	60
6	23, 5	20	18	17, 5	16, 5	16	14, 5	13, 5
7	28	24, 5	22, 5	20	16, 5	15, 5	13, 5	13
8	23, 5	20	18	16, 5	15, 5	14	12, 5	12
9	19, 5	18, 5	16, 5	14	13, 5	12	10, 5	10
10	19, 5	18, 5	16, 5	15, 5	14, 5	13, 5	12	11, 5

Les quantités de perchlorate sont 6. 7. 8. 9 et 10 ml. Les tableaux XIII XIV et XV résument les résultats.
On trace les courbes en fonction du temps pour voir l'évolution de la coloration (graphiques XIX, XX, XXI).
- 6 ml : pour chaque solution, nous obtenons une courbe de densité optique élevée dont la décroissance est faible
- 7 ml : la densité optique de la coloration est plus élevée avec ce volume qu'avec les autres, mais sa diminution est beaucoup plus rapide
- 8. 9. 10. ml : dans le cas de ces trois volumes, les densités optiques sont du même ordre, inférieures à celles obtenues précédemment mais de stabilité meilleure.

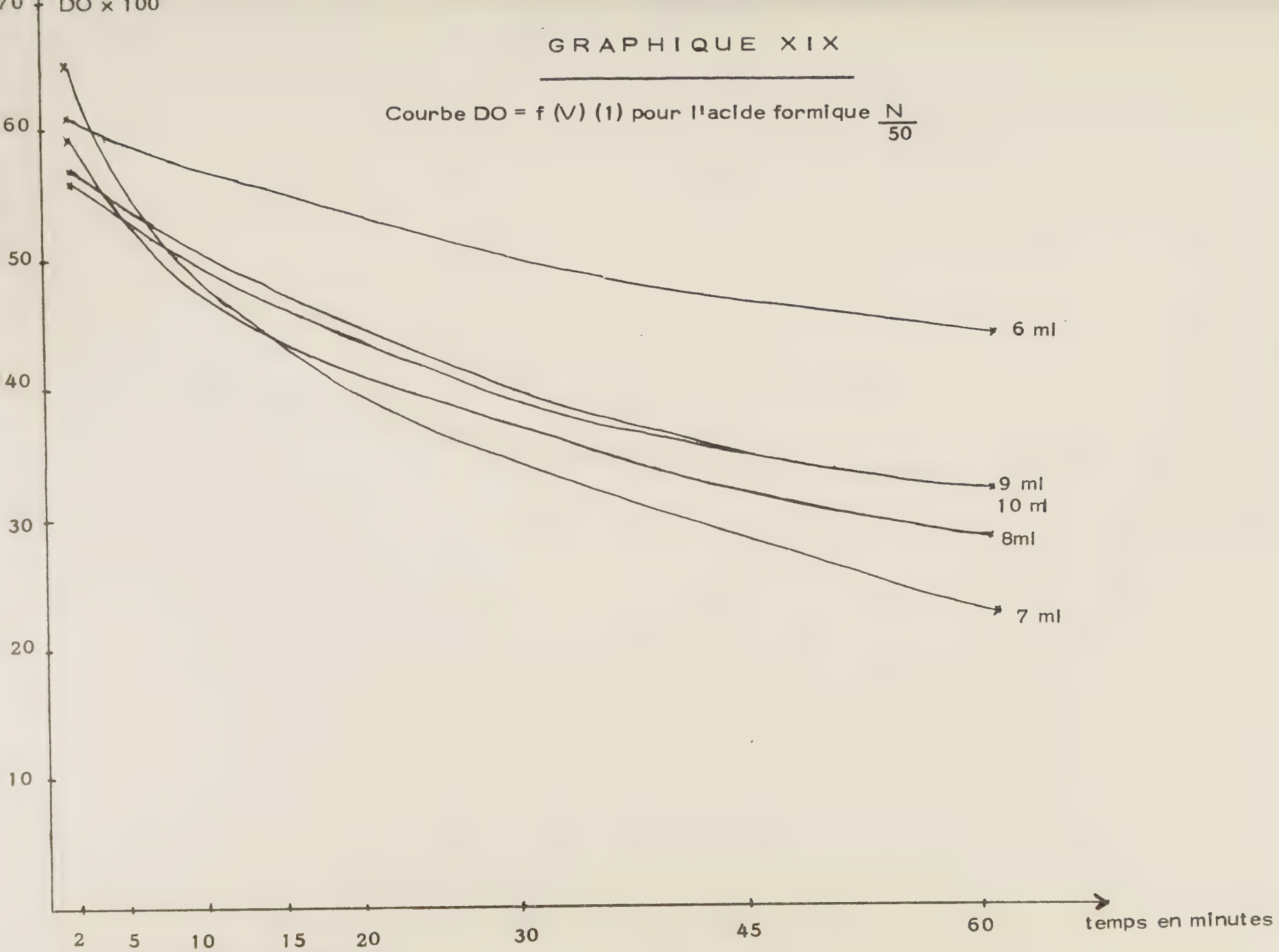
c) Remarques :

α) avec 6 ml, dans certains cas de concentration de la solution acide, on observe une floculation comme celle que nous avions notée avec 5 ml de réactif au perchlorate. Elle empêche toute mesure de densité optique. De plus, avec ce volume, la teinte, au lieu d'être violette, est plutôt marron et peut donc s'éloigner de la coloration que l'on recherche.

β) La coloration violette est obtenue avec le volume de 7 ml comme avec celui de 10 ml, mais elle diminue beaucoup plus rapidement, en particu-

GRAPHIQUE XIX

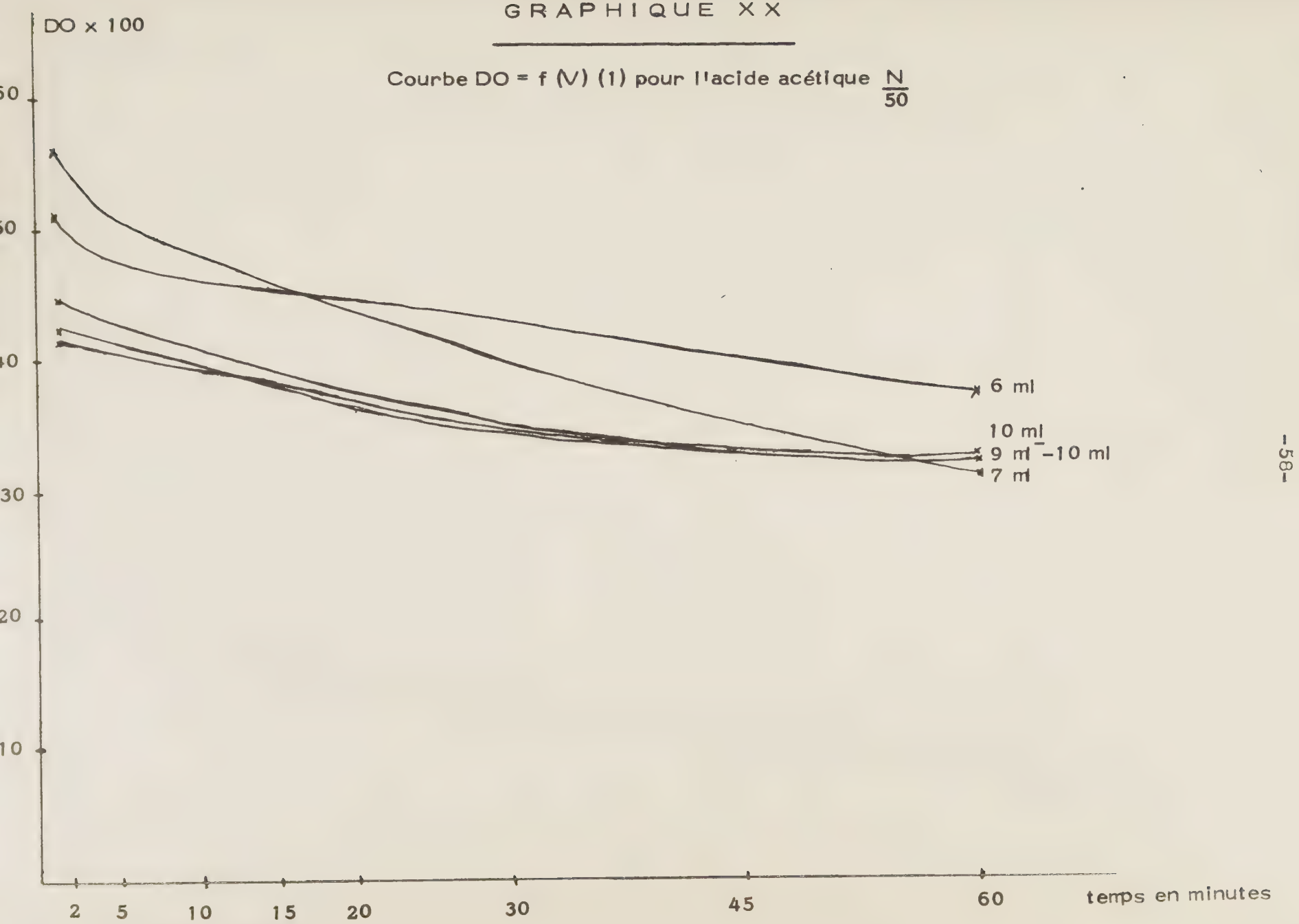
Courbe DO = f (V) (1) pour l'acide formique $\frac{N}{50}$



(1) V = Volume de perchlorate

GRAPHIQUE XX

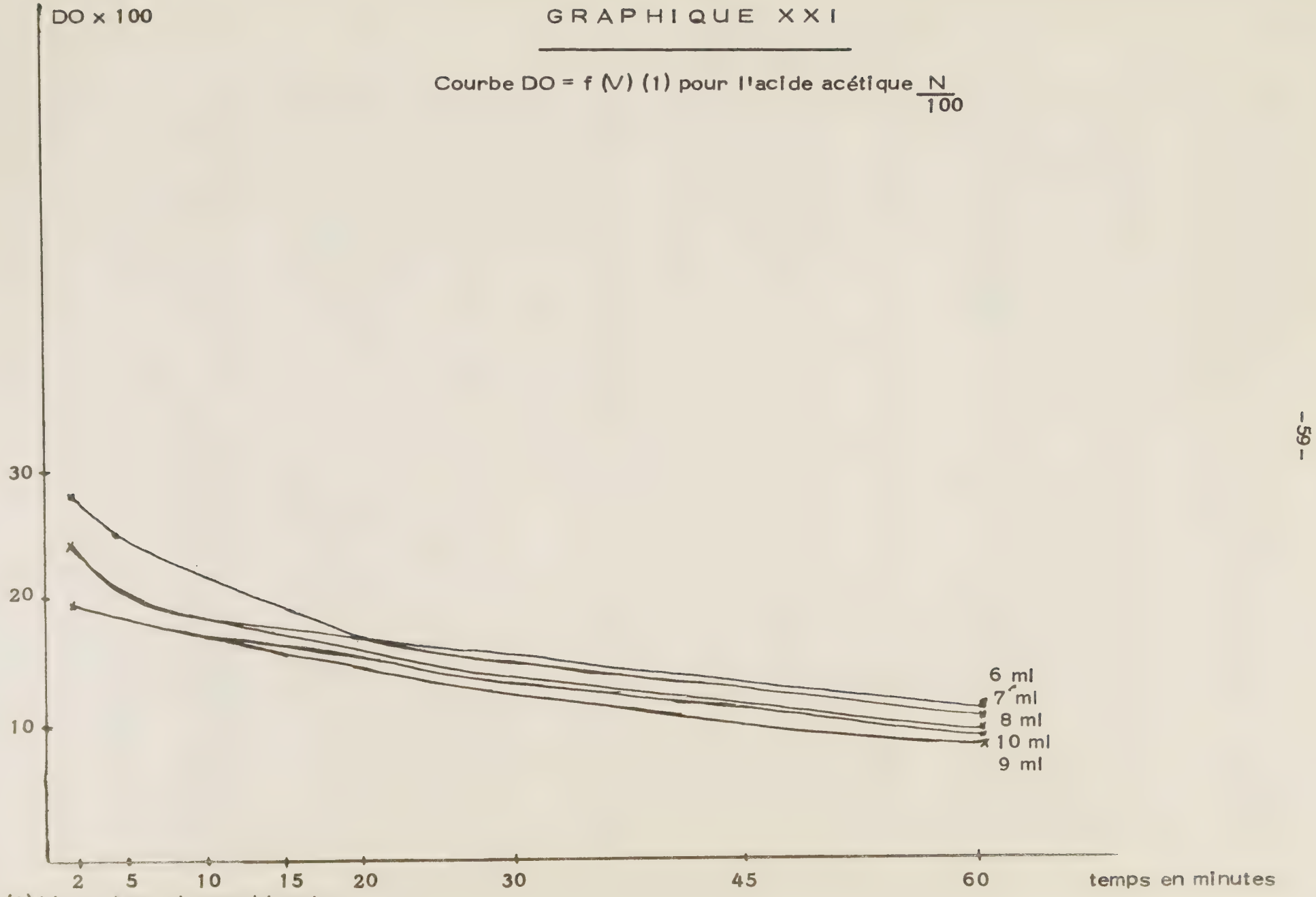
Courbe DO = f (V) (1) pour l'acide acétique $\frac{N}{50}$



) V = volume de perchlorate

GRAPHIQUE XXI

Courbe DO = f (V) (1) pour l'acide acétique $\frac{N}{100}$



(1) V = volume de perchlorate

lier pour l'acide formique. Chaque acide a donc ses caractéristiques dont ne peut rendre compte un dosage global. Si l'acide formique est en grande quantité dans une solution de différents acides, la diminution rapide de la densité optique obtenue après réaction avec 7 ml, nuit à une bonne reproductibilité.

β) Les volumes de 8, 9 ou 10 ml conduisent à la même densité optique. Nous avons donc à choisir entre le volume de 7 ml et celui de 10 ml. La densité optique diminue en fonction du temps, par conséquent pour avoir une bonne sensibilité nous devons lire le résultat au spectrophotomètre dans un délai assez court, mais ceci n'est possible que si la diminution de la coloration n'est pas trop rapide. Le volume initial de 10 ml nous assure une bonne reproductibilité avec un temps de lecture de cinq minutes. Nous testerons cependant parallèlement les solutions avec 7 ml de perchlorate et le même délai de lecture.

2° - Prise d'essai

PESEZ effectue un dosage sur une prise d'essai de 0, 5 ml à laquelle il ajoute 1 ml de réactif N N' à 1 % puis 1 ml de réactif hydroxylamine-soude.

En prenant un volume supérieur de liquide à doser, on peut espérer accroitre la sensibilité.

Mais cette modification risque d'entrainer un déséquilibre dans les proportions si nous maintenons à 1 ml les volumes de réactif N N' à 1 % et de réactif hydroxylamine-soude.

Nous employons 1 ml de prise d'essai et étudions en conséquence :

. le volume et la concentration du réactif N N'

. le volume du réactif hydroxylamine-soude.

a) Réactif N N' et prise d'essai

- Volume : Deux solutions d'acide acétique ajustées à pH 3 ($\frac{N}{100}$ et $\frac{N}{50}$) sont testées avec les proportions suivantes :

1 ml de prise d'essai
2 ml de réactif N N' à 1 %
1 ml de réactif hydroxylamine-soude

Nous ajoutons 10 ml d'une part et 7 ml d'autre part de réactif au perchlorate pour contrôler l'essai précédent.

Ces deux solutions sont également testées avec les proportions de PESEZ (0, 5 ml de prise d'essai et 1 ml de réactif N N') en employant 10 ml et 7 ml de perchlorate pour nous servir de référence.

Le tableau XVI résume tous les résultats. Nous savons qu'une solution $\frac{N}{100}$ d'acide acétique correspond à 600 µg/ml. Ceci nous donne le poids d'acide ayant réagi pour chaque proportion de réactifs étudiée. De même la solution $\frac{N}{50}$ correspond à 1200 µg/ml.

Dans une dernière colonne nous notons le volume final.

- Remarques :

α) En ce qui concerne une même solution, la densité optique est réellement augmentée quand nous doublons les volumes des prises d'essai et du réactif N N' à 1 % , que l'on emploie 10 ou 7 ml de réactif au perchlorate mais elle n'est pas doublée.

TABLEAU XVI

Influence du volume de la prise d'essai et du réactif au perchlorate sur la densité optique (DO x 100)

Proportions Titre	Réactif au perchlorate (ml)	Prise d'essai (ml)	Poids d'acide (µg)	Densité optique	Volume final (ml)
N/100	10	0, 5	300	19	12, 5
		1	600	29	14
	7	0, 5	300	25	9, 5
		1	600	34	11
N/50	10	0, 5	600	41	12, 5
		1	1200	61	14
	7	0, 5	600	52	9, 5
		1	1200	65	11

β) Si nous considérons, par contre, le poids d'acide ayant réagi, la densité optique est diminuée : 600 µg dans 1 ml donnent une intensité de coloration bien inférieure à 600 µg dans 0, 5 ml. Les modifications du volume final porté de 12, 5 à 14 ml pour 10 ml de perchlorate et de 9, 5 à 11 ml pour 7 ml de perchlorate ne suffisent pas à expliquer ces écarts importants.
Les différences tiendraient à ce que l'on se place dans des conditions nouvelles (variations du pH final)

γ) Nous ne pouvons par conséquent comparer les résultats qu'en opérant dans les mêmes conditions et effectivement nous notons une

proportionnalité intéressante des chiffres obtenus quand nous dosons les 2 solutions en employant les mêmes quantités de réactif. La densité optique est sensiblement doublée quand le titre est doublé. Dans le tableau suivant sont groupés les résultats (nous notons le poids d'acide que nous titrons avec chaque proportion de réactifs)

Volume final (ml)	Proportions : Prise d'essai (ml)	Proportions : Réactif au perchlorate (ml)	Poids d'acide acétique µg (titre)	Densité optique (DO x 100)
12, 5	0, 5	10	$300 \left(\frac{N}{100}\right)$	19
			$600 \left(\frac{N}{50}\right)$	41
9, 5	0, 5	7	$300 \left(\frac{N}{100}\right)$	25
			$600 \left(\frac{N}{50}\right)$	52
14	1	10	$600 \left(\frac{N}{100}\right)$	29
			$1200 \left(\frac{N}{50}\right)$	61
11	1	7	$600 \left(\frac{N}{100}\right)$	34
			$1200 \left(\frac{N}{50}\right)$	65

Ces nouveaux volumes n'augmentent donc pas la sensibilité de la réaction, mais ils permettent de doser des solutions de titre plus faible.

- Concentration

Pour que la dilution soit moindre nous pouvons conserver le même volume de réactif N N' en portant à 2 % sa concentration.
Nous testons ainsi une solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique à pH3. Nous ajoutons 10 ml d'une part et 7 ml d'autre part de réactif au perchlorate. Les réactions pratiquées ne sont pas lisibles par suite de l'apparition d'une floculation. Il semble que l'on favorise l'insolubilité du réactif N N' dans l'eau en augmentant sa concentration.
Pour 1 ml de prise d'essai nous emploierons donc 2 ml de réactif N N' à la concentration de 1 %.

b) Réactif hydroxylamine-soude et prise d'essai

On ne peut changer la concentration ici. Pour conserver le rapport initial des différents réactifs de la réaction de PESEZ nous faisons le dosage avec les proportions suivantes :

- 1 ml de prise d'essai
- 2 ml de réactif N N' à 1 %
- 2 ml de réactif hydroxylamine-soude
- 10 ml de réactif au perchlorate

La solution acide testée est une solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique ajustée à pH 3.

Le dosage est impossible par suite d'un trouble incolore qui se produit après l'addition du réactif au perchlorate.

Par conséquent, nous continuerons d'employer le volume initial de 1 ml pour ce réactif hydroxylamine-soude.

B - LONGUEUR D'ONDE

PESEZ travaille à une longueur d'onde de 500 nm, optimum pour la coloration de la réaction.

Nous avons toujours opéré à cette longueur d'onde.

En établissant le spectre de la coloration, nous recherchons si une autre longueur d'onde (λ max.) n'augmenterait pas la densité optique donc la sensibilité.

Nous testons : 400. 450. 500. 550. 600 et 700 nm.

La solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique nous sert de référence. La prise d'essai est de 1 ml avec 2 ml de réactif N N' à 1 % et 10 ml de perchlorate.

Pour chaque longueur d'onde, nous faisons un blanc réactif à pH3. Donc nous avons 6 blancs et 6 dosages.

Les densités optiques lues au bout de 5 minutes, sont les suivantes :

- 400 nm : < 0, 08
- 450 nm : 0, 33
- 500 nm : 0, 59
- 550 nm : 0, 48
- 600 nm : 0, 25
- 700 nm : 0

La meilleure densité optique se situe à 500 nm : λ max. . Traçons la courbe traduisant la densité optique en fonction de la longueur d'onde (graphique XXII) c'est-à-dire le spectre de la coloration : mais ce spectre reste incomplet à cause du petit nombre de points établis.

C - TEMPERATURE

La température a peut-être un rôle dans le rendement de la réaction en favorisant d'une part la déshydratation et l'estérification, d'autre part la coloration.

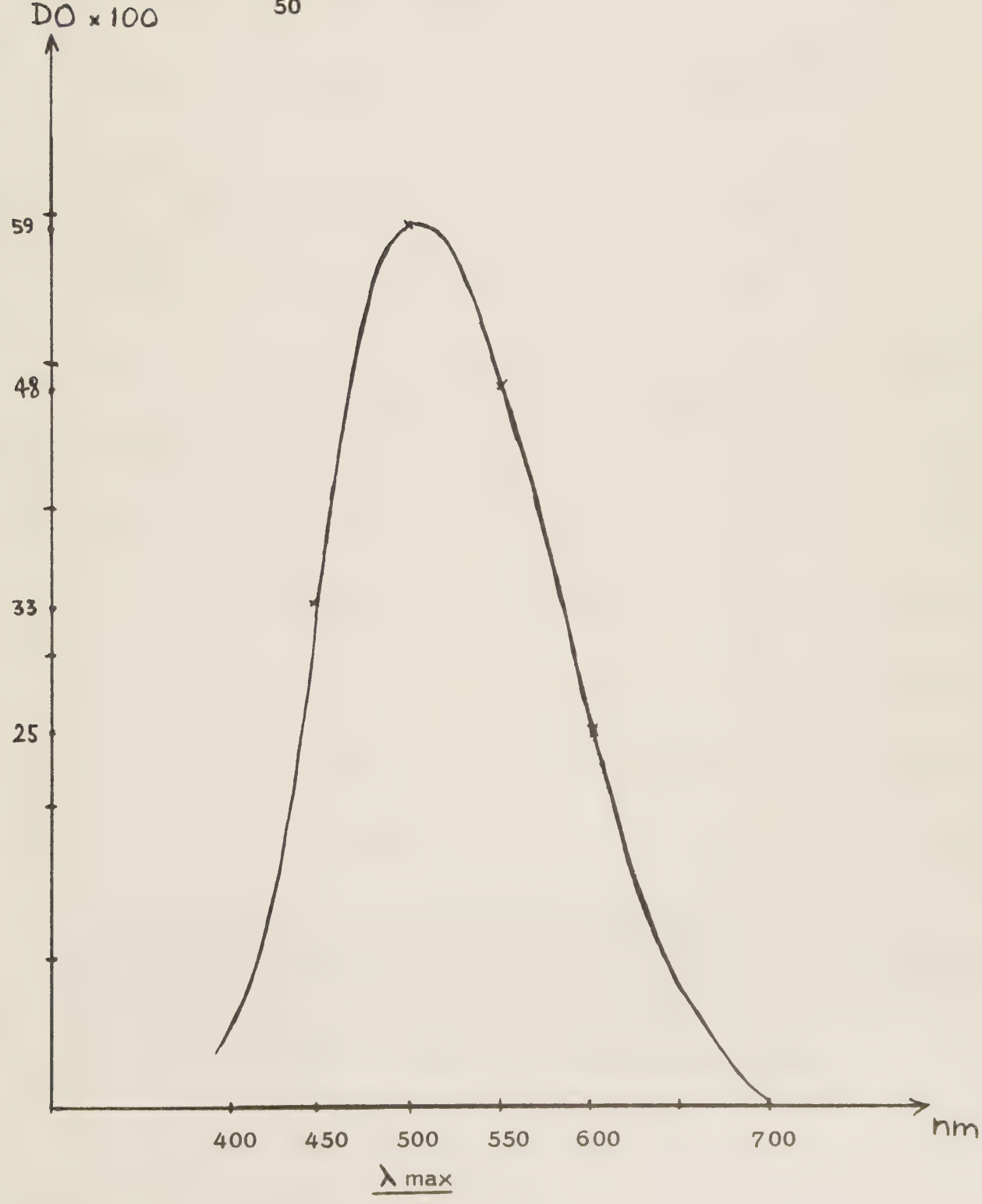
Nous étudions trois conditions de température :

- ordinaire
- 37 ° C
- 60 ° C

La solution de référence est celle d'acide acétique $\frac{N}{50}$ à pH 3. Les blancs sont dosés dans les mêmes conditions.

GRAPHIQUE XXII

Etude de la densité optique en fonction de la longueur d'onde (solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique)



Nous effectuons toute la réaction à la température choisie ou seulement la dernière partie de la réaction : l'addition du réactif au perchlorate (10 ml)

1° - A température ordinaire
La densité optique obtenue est 0, 59.

2° - A 37 °C
Toute la réaction effectuée au bain-Marie à 37 °C, les réactifs étant ajoutés à cette température, se traduit par une densité optique de 0, 59 également.
En faisant la réaction à la température du laboratoire jusqu'à l'addition de perchlorate, et en mettant au bain-Marie à 37 ° C juste avant d'ajouter les 10 ml de perchlorate eux mêmes à 37° C, la densité optique diminue à 0, 52.

3° - A 60 ° C
Toute la réaction est effectuée au bain-Marie à 60°C (en bouchant les tubes à cause de l'évaporation). La densité optique est de 0, 45.
En mettant à 60 ° C la solution au moment de la coloration, nous obtenons le chiffre de 0, 42.
Tous les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Températures de déshydratation	Températures de coloration	Densité optique (DO x 100)
20-22° C	20-22° C	59
20-22° C	37° C	52
20-22° C	60° C	42
37° C	37° C	59
60° C	60°C	45

La température de 37° C n'a pas d'action notable sur la réaction, car le résultat est le même qu'à la température de laboratoire.
Mais à 60° C la réaction est plus faible, ce qui peut s'expliquer par une détériorisation partielle des réactifs à cette température ou par une diminution de coloration très rapide dans les cinq premières minutes, la réaction étant accélérée par la température.
Nous manipulerons donc toujours à la température ordinaire.

D - TEMPS D'ACTION DES REACTIFS

1° - Réactif N N'

La déshydratation suivie de l'estérification par le réactif N N' en solution dans le méthanol est indispensable, puisque la transformation en acide hydroxamique ne peut s'effectuer qu'à partir d'un ester d'acide.
Le temps d'action de ce réactif est de 15 minutes dans la technique de PESEZ. En le faisant varier nous allons mettre en présence 1 ml de la solution acide de référence $\frac{N}{50}$ et 2 ml de réactif N N' à 1 %. Nous choisissons 5, 15 et 30 minutes dans une première série d'expériences et nous prolongeons à 45, 60 et 120 minutes dans une deuxième série.
Les autres temps de la réaction restent inchangés.
Dans la première série d'expériences nous trouvons, avec 7 ml de perchlorate, les densités optiques suivantes :

5 minutes : 0,58
15 minutes : 0,68
30 minutes : 0,75

La sensibilité augmente d'une façon certaine avec le temps d'action du réactif déshydratant :
La deuxième série d'expériences nous permet d'atteindre un palier définissant le temps suffisant pour une déshydratation et une estérification maximales. On emploie ici les deux volumes de réactif au perchlorate.
Nous groupons les résultats sous forme d'un tableau qui nous indique qu'après un temps de contact de 30 minutes, la densité optique fournie a atteint le chiffre maximum.

Temps (mn)	Densité optique (DO x 100)	
	10 ml de perchlorate	7 ml de perchlorate
5	51	57
15	60	66
30	68	74
45	66	75
60	68	75
120	68	74

Nous laisserons donc les réactifs en contact 30 minutes au lieu de 15.

2° - Réactif hydroxylamine-soude

Nous avons augmenté le temps d'action du réactif N N' sur la solution acide, et la sensibilité s'en est trouvée améliorée.

Il est possible qu'en prolongeant le contact avec le réactif hydroxylamine soude, nous obtenions une nouvelle amélioration.

Prenons 1 ml d'une solution d'acide acétique $\frac{N}{50}$ à pH 3 et, en maintenant le temps d'action du réactif N N' à 30 minutes on prolonge celui du réactif hydroxylamine-soude à 30 minutes ; le volume de perchlorate est de 10 ml.

La densité optique est de 0, 68 quel que soit le temps d'action de l'hydroxylamine: 15 ou 30 minutes. La réaction est donc totale en 15 minutes.

E - TABLEAU RECAPITULATIF

Le tableau XVII résume les modifications que nous avons apportées à la réaction de PESEZ et les résultats qui s'ensuivent (cf. tableau XVI).

L'acide acétique en solution $\frac{N}{50}$ est employé comme test : la densité optique passe de 0, 41 à 0, 68.

Cela nous conduit à la proposition d'une technique quantitative.

TABLEAU XVII

Résultats obtenus à partir d'une solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique après modifications de la réaction de PESEZ.

Réactif au perchlorate (ml)	Prise d'essai (ml)	Solution de réactif N N' 1 % (ml)	DO x 100 après 15' réactif NN'	DO x 100 après 30' réactif NN'
10	0, 5	1	41	
	1	2	60	68
7	0, 5	1	51	
	1	2	67	74

II - PROPOSITION D'UNE TECHNIQUE QUANTITATIVE

A - CONDITIONS OPTIMALES

Après avoir modifié la technique de PESEZ, nous allons étudier la valeur quantitative de cette nouvelle méthode en nous plaçant dans les conditions optimales que nous venons de définir :

- 1 ml de prise d'essai à pH 3
- 2 ml de solution N N' à 1 % dans le méthanol

Contact 30 minutes

- 1 ml de réactif hydroxylamine-soude

Contact 15 minutes

- 10 ml de réactif au perchlorate

Nous lisons à 500 nm la densité optique de la coloration obtenue au bout de 5 minutes contre un blanc réactif traité dans les mêmes conditions. Nos réactifs sont préparés extemporanément.

B - CARACTERE QUANTITATIF

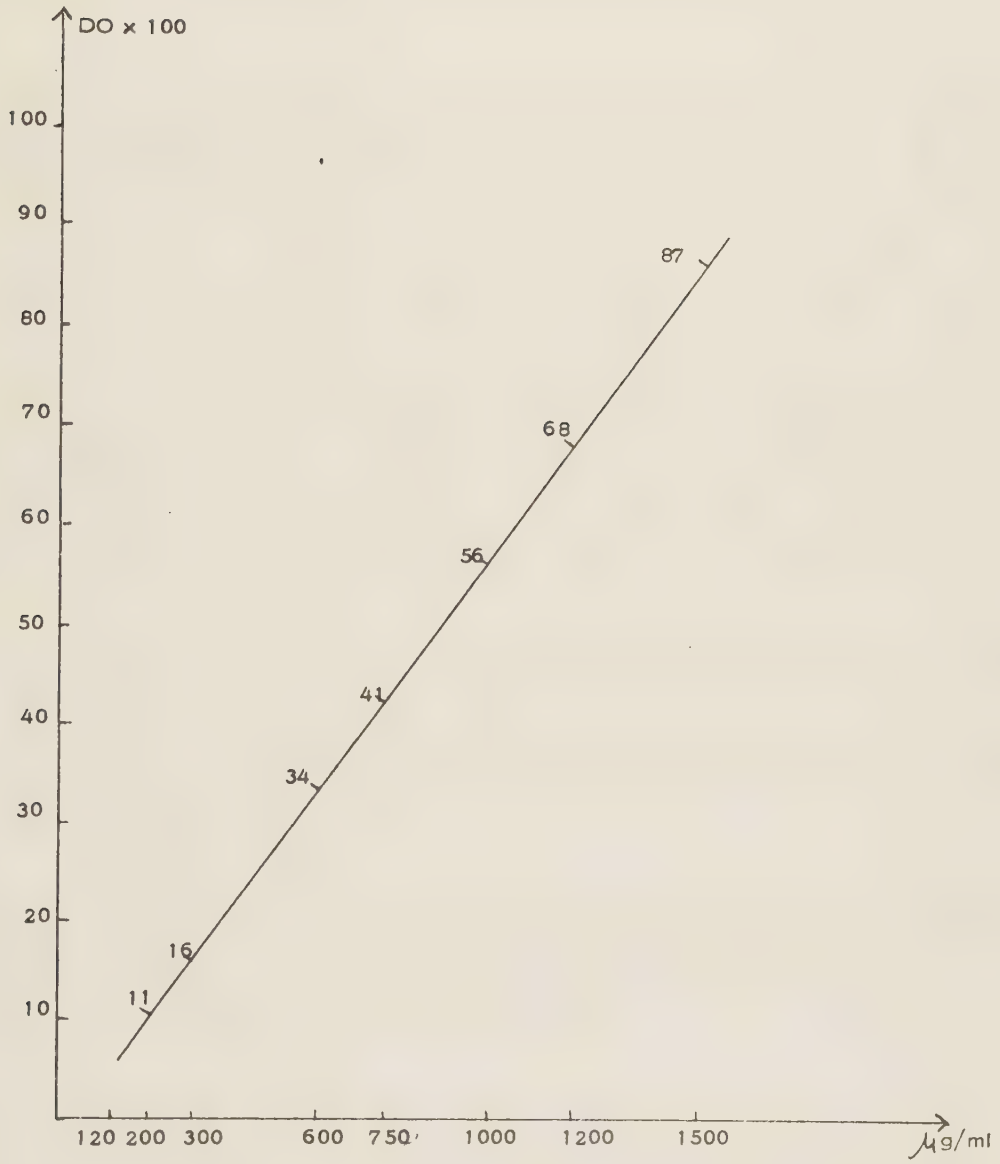
Nous dosons différentes dilutions d'une solution normale d'acide acétique (60 g/l) allant de $\frac{N}{500}$ à $\frac{N}{30}$. Pour chaque concentration le pH est ajusté à 3 avant dilution finale soit avec de l'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$ soit avec de la soude N. Le tableau suivant donne pour chaque titre la correspondance en μg dans 1 ml (poids d'acide dans la prise d'essai) et la densité optique de réaction (cf. tableaux X et XI). Nous pouvons ainsi établir le graphique XXIII qui est une droite (cf. graphique X). Ceci indique que les modifications de la réaction n'ont pas altéré son caractère quantitatif : nous appliquons toujours la loi de BEER-LAMBERT.

titre CH_3-COOH	$\frac{N}{500}$	$\frac{N}{300}$	$\frac{N}{200}$	$\frac{N}{100}$	$\frac{N}{80}$	$\frac{N}{60}$	$\frac{N}{50}$	$\frac{N}{40}$	$\frac{N}{30}$
poids d'acide ayant réagi (μg)	120	200	300	600	750	1000	1200	1500	2000
densité optique DOx100	<8	11	16	34	41	56	68	87	>100

Nous éliminons la dilution $\frac{N}{30}$ qui donne une densité optique supérieure à 1.

GRAPHIQUE XXIII

Dosage de l'acide acétique par la méthode modifiée



C - RESULTATS COMPARES DE CETTE TECHNIQUE ET DE CELLE DE PESEZ

Dans la méthode de PESEZ, nous avons utilisé des titres en acide acétique allant de $\frac{N}{250}$ à $\frac{N}{10}$. Nous ne parlerons pas de cette dernière dilution qui conduisait à une densité optique supérieure à 1.
Nous rassemblons dans un même tableau les résultats obtenus par ces deux techniques en notant, pour chaque titre testé, en parallèle, les µg ayant réagi et la densité optique qui en est résultée.

éthode mployée	Titre CH 3 -COOH	N/500	N/300	N/250	N/200	N/150	N/100	N/80	N/60	N/50	N/40	N/30
ESEZ	µg ds 0,5 ml			120		200	300			600		1000
	DO x100			8		13	20			40		66
odifiée	µg ds 0,5 ml	120	200		300		600	750	1000	1200	1500	
	DOx100	<8	11		16		34	41	56	68	87	

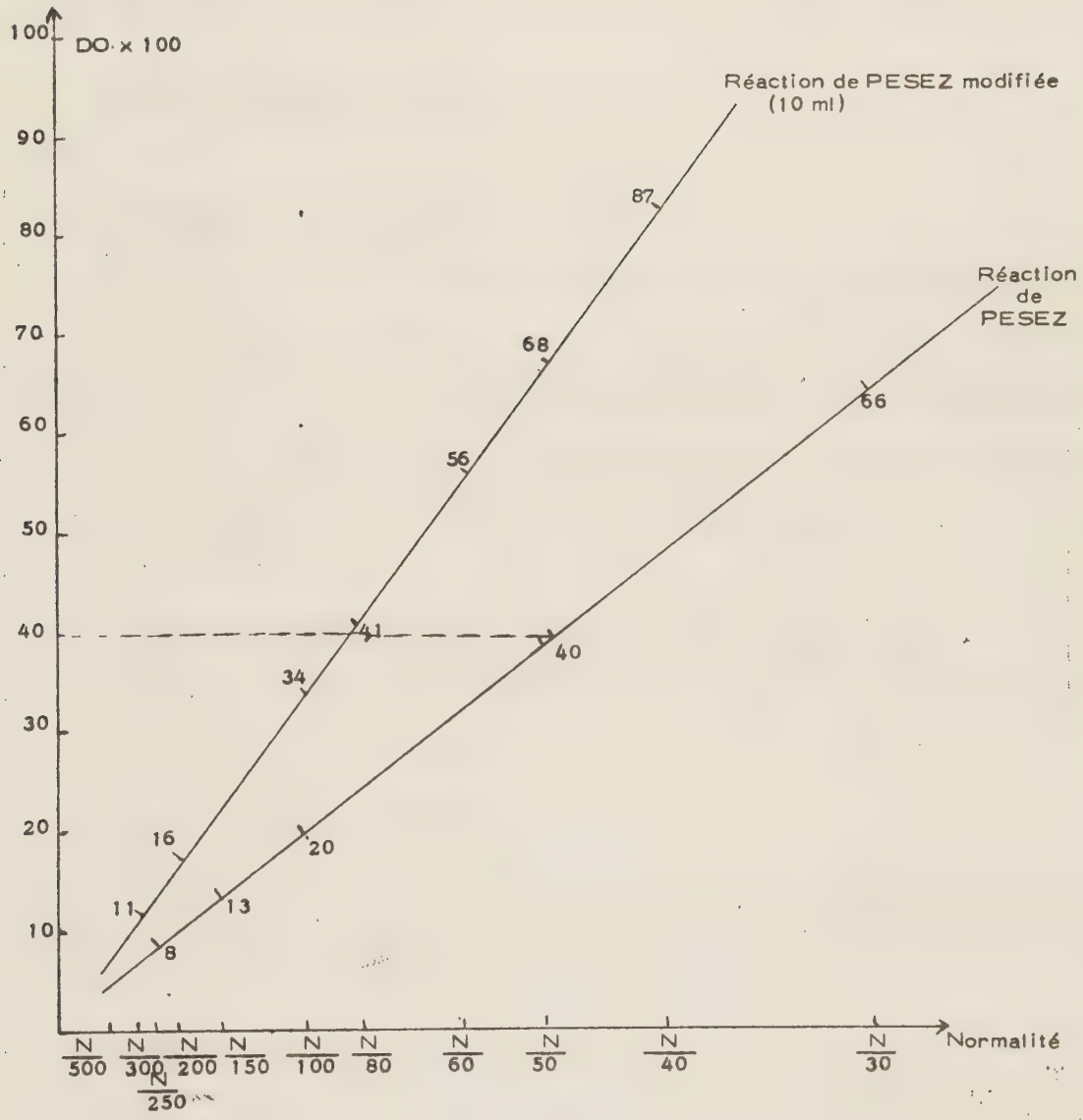
Sur un même système graphique (normalité en abscisses et densité optique en ordonnées) nous traçons les droites représentatives de chaque méthode (graphique XXIV)
Le seuil de sensibilité est de 120 µg dans la réaction de PESEZ et de 150 µg dans la méthode modifiée (densité optique = 0, 08) mais en normalité ce seuil passe de $\frac{N}{250}$ à $\frac{N}{400}$.
Les conditions différentes réalisées par la méthode initialement décrite par PESEZ et la nôtre nous permettent de doser une même quantité de dérivé en travaillant sur des solutions plus diluées ; mais rien n'a changé en ce qui concerne la sensibilité : par exemple une densité optique de 0, 40 est obtenue à partir d'une solution $\frac{N}{80}$ au lieu de $\frac{N}{50}$.

D- CONSERVATION DES REACTIFS

Dans tous les essais précédents, les réactifs étaient préparés au moment de l'emploi. Dans le cadre d'une application à une analyse biologique, des réactifs déjà prêts simplifient le mode opératoire ; mais cette possibilité n'est à envisager que si les réactifs conservent au cours du temps toute leur activité, c'est à dire ne subissent ni altération, ni hydratation.
Nous étudions la conservation de chacun d'eux :

- réactif au perchlorate
- réactif N N'
- réactif hydroxylamine-soude

GRAPHIQUE XXIV



Pour effectuer cette étude, chaque réactif doit être testé à des intervalles de temps réguliers après sa préparation, tous les autres réactifs étant faits extemporanément.
L'acide acétique $\frac{N}{50}$ à pH 3 sert de solution de référence.
Le zéro du pho- tomètre est fait avec un blanc préparé à partir des mêmes réactifs.
Les réactions sont effectuées dans les conditions optimales précédemment définies.
Dans ce mode opératoire, en n'utilisant que des réactifs extemporanés, la solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique donne une coloration dont la densité optique est de 0,68.

1° - Réactif au perchlorate
Ce réactif se prépare en général à partir d'une solution-mère juste avant l'emploi.

a) Vieillissement de la solution-mère
Nous faisons 2 réactions :
- l'une avec le réactif au perchlorate préparé à partir d'une solution mère fraîche.
- l'autre avec le réactif au perchlorate préparé à partir d'une solution-mère de 2 mois conservée à la température du laboratoire.
Nous testons au bout de 30 minutes contre le blanc correspondant.
Les autres réactifs sont neufs.
Les densités optiques ainsi obtenues sont de 0,65 avec la solution-mère fraîche et de 0,66 avec la solution-mère de 2 mois.
La solution-mère de perchlorate se conserve donc très bien à la température ordinaire.

b) Vieillissement du réactif dilué au perchlorate
Ce réactif fait avec la solution-mère fraîche est gardé.:
- pendant 48 heures à la température du laboratoire et testé ; les autres réactifs sont neufs.
La densité optique est 0,60
- pendant 4 jours
La densité optique est 0,58
- pendant une semaine
La densité optique est de 0,52
Le vieillissement de la solution diluée intervient donc dans la sensibilité. Par conséquent, les tests seront toujours faits avec un réactif au perchlorate préparé au moment de l'emploi.

2° - Réactif N N'
Nous connaissons son rôle déshydratant.
Nous conservons pendant toute la durée des tests la même solution de réactif que nous répartissons en deux flacons, l'un étant maintenu à + 4° C l'autre à la température du laboratoire.
Nous testons ces deux solutions au bout de 4. 7. 11. 14. 18 et 21 jours en employant chaque fois perchlorate et hydroxylamine préparés juste avant l'emploi.
Pour chaque mesure, le zéro du spectrophotomètre est fait avec le blanc correspondant.
Les résultats sont résumés dans le tableau XVIII.

Le N N' s'altère rapidement.
Conservé à + 4°C, sa réactivité est diminuée légèrement au bout de 4 jours et nettement dès une semaine.
Conservé à + 20 22° C, la diminution est nette dès le 4 ème jour.
De plus, lorsque ce réactif est récent, nous notons qu'il précipite lors du mélange avec la solution acide. Cette floculation ne se produit plus lorsque le réactif a vieilli : en particulier au bout de 4 jours, le trouble n'apparait que si la conservation a eu lieu à + 4°C.
On peut en conclure qu'en l'absence de précipitation, le réactif a vieilli et doit être rejeté.
Le blanc réactif donne également lieu à cette précipitation et reflète donc l'état des réactifs.

TABLEAU XVIII

Vieillissement du réactif N N' (DO x 100)

Réaction maximum (DOx100)	température de conservation	4 j	7 j	11 j	14 j	18 j	21 j
68	+ 4° C	63	59	51	49	41	32
	+ 20° C	57	47	35	29	25	17

TABLEAU XIX

Vieillissement du réactif hydroxylamine-soude (DO x 100)

Réaction maximum (DOx100)	température de conservation	4 j	7 j	11 j	14 j	18 j	21 j
68	+ 4° C	66	65	63	60	60	59
	+ 20° C	66	66	63	58	59	59

On peut se demander si la perte d'activité ne peut pas être compensée par un maintien prolongé du contact.
On effectue pour cela parallèlement avec le même réactif N N' conservé, un essai avec un temps d'action de 60 minutes.
La réaction est faite sur la même solution d'acide acétique $\frac{N}{50}$
Les résultats (DO x 100) sont comparés avec ceux obtenus avec 30 minutes de temps d'action (maximum : 68)

Conservation	Temps d'action	4 j	7 j	11 j	14 j	18 j	21 j
+ 4° C	30 mn	63	59	51	49	41	32
	60 mn	62	58	50	49	39	32
+ 20° C	30 mn	57	47	35	29	25	17
	60 mn	57	46	32	29	26	17

Le temps d'action ne peut pallier une mauvaise conservation du réactif. La réaction maximum est toujours atteinte au bout de 30 minutes. L'hydratation n'entre pas seule en jeu dans le vieillissement du réactif N N' ; il se produit également une altération irrémédiable au cours de la conservation.

3° - Réactif hydroxylamine-soude
On le prépare extemporanément à partir de 2 solutions méthanoliques, l'une de soude, l'autre d'hydroxylamine. Chacune de ces solutions est répartie en deux lots conservés différemment :
- l'un à + 4° C
- l'autre à la température ordinaire

On apprécie la valeur des solutions au bout de 4. 7. 11. 14. 18 et 21 jours. Le N N' et le perchlorate sont faits juste avant l'emploi. Les résultats sont résumés dans le tableau XIX. La température n'intervient pas car la densité optique ne varie pas entre + 4° C et + 20°C .
Pendant 10 jours, la réaction se maintient au maximum. Par la suite la densité optique diminue sans que l'on puisse dire si ce sont les deux solutions qui se sont altérées, ou une seule, et dans ce cas laquelle des deux.
La conservation des deux solutions servant à préparer le réactif hydroxylamine-soude est donc possible : pendant dix jours à la température du laboratoire.

4° - Conclusion

Nous devons donc, pour conserver les réactifs, tenir compte de deux facteurs:

- le temps
- la température de conservation

Le réactif N N' se conserve 4 jours à + 4° C. Passé ce délai, il n'est plus utilisable et l'on ne peut compenser cette mauvaise conservation par un maintien prolongé du contact.

Les solutions d'hydroxylamine et de soude se conservent dix jours à 20 22° C.

La solution-mère de perchlorate peut être gardée plus d'un mois à température ordinaire.

La solution diluée prête à l'emploi doit être préparée juste avant son utilisation.

Rappelons l'importance du blanc réactif en ce qui concerne l'état des réactifs.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

TROISIEME PARTIE

APPLICATION A L'ANALYSE FECALE

I - MODIFICATIONS DE LA TECHNIQUE APPLIQUEE AUX SELLES

Nous avons déjà appliqué la technique de PESEZ à l'analyse fécale : elle se fait en trois temps :

1° - Eclaircissement
- dilution de la selle au $\frac{1}{5}$
- clarification par per- chlorure-chaux
- ajustage à pH 3 par H Cl N/5

Le liquide limpide à doser représente finalement une dilution au $\frac{1}{7,5}$ de la selle.

2° - Réaction
- 0, 5 ml de liquide à doser
- 1 ml de réactif N N' à 1 %

Contact 15 minutes
- 1 ml de réactif hydroxylamine-soude

Contact 15 minutes
- 10 ml de réactif au perchlorate

3° - Lecture au bout de 5 minutes

Dans ces conditions nous avions une sensibilité insuffisante : une densité optique de 0, 40 n'était obtenue que pour une selle très riche en acides organiques.

Dans ce chapitre nous sensibilisons la technique de façon à obtenir cette densité optique à partir d'une selle dont la teneur en acides organiques est normale. Nous y apportons les modifications étudiées :
- volume des réactifs
- temps d'action du réactif N N'

La dilution de la selle ne peut être diminuée.

A - VOLUME DES REACTIFS

Trois dilutions fécales préparées à partir des selles 8. 9. 10 dans les conditions définies précédemment sont dosées par quatre combinaisons de réactifs dont l'une est celle décrite par PESEZ.

Volume de prise d'essai (ml)	Volume de réactif N N' à 1% (ml)	Volume de perchlorate (ml)
0, 5	1	10 (PESEZ)
		7
1	2	10
		7

Le temps de contact entre la solution à doser et le réactif N N' est de 15 minutes. La lecture photométrique est faite au bout de 5 minutes contre le blanc réactif correspondant à chaque cas.
Le tableau XX montre que l'augmentation de densité optique est surtout dûe au volume doublé de la prise d'essai plutôt qu'à la diminution du volume de perchlorate. En couplant l'augmentation du volume de prise d'essai et la diminution de celui de perchlorate, il semble que l'on obtienne les résultats optimum. Mais l'étude analytique a montré que le volume de 7 ml conduit à une instabilité de la coloration.
Dans le cas d'un dosage fécal, il est possible que cette instabilité demeure, mais il se peut aussi qu'elle soit compensée. Les densités optiques obtenues avec la selle 8 sont suivies en fonction du temps.
Les résultats sont rapportés sur le tableau XXI et portés ensuite sur un graphique (XXV)
La décroissance de la densité optique est très faible pour 0, 5 ml de prise d'essai et 10 ml de perchlorate ; pour 1 ml et 10 ml aussi mais pour 1 ml et 7 ml la décroissance est trop rapide pour un dosage précis.
Nous adoptons donc le volume de 1 ml de prise d'essai.

TABLEAU XX

Densités optiques obtenues avec différentes proportions de réactifs lors du dosage des 3 selles 8. 9. 10. (DO x 100)

Prise d'essai (ml)	0, 5		1	
Perchlorate (ml)	10	7	10	7
Selles (1) 8	30	33, 5	43	48
9	37	41	50, 5	57, 5
10	35	38	49	55
Résultats	la plus faible densité optique	faible augmentation	forte augmentation	la plus forte densité optique

(1) Méthode de BAILENGER
selle 8 : 21 ml d'HCl N
selle 9 : 24 ml d'HCl N
selle 10 : 23 ml d'HCl N

TABLEAU XXI

Densités optiques en fonction du temps obtenues à partir de la selle 8 avec différentes proportions de réactifs (DO x 100)

Temps / Proportions	2	5	10	15	20	30	45	60
0, 5. 1. 10	31	30	29, 5	29	28, 5	27, 5	27	27
1. 2. 10	44, 5	43	41	39	37	35	34	32
1. 2. 7	51	48	45	42, 5	41	38, 5	36	33

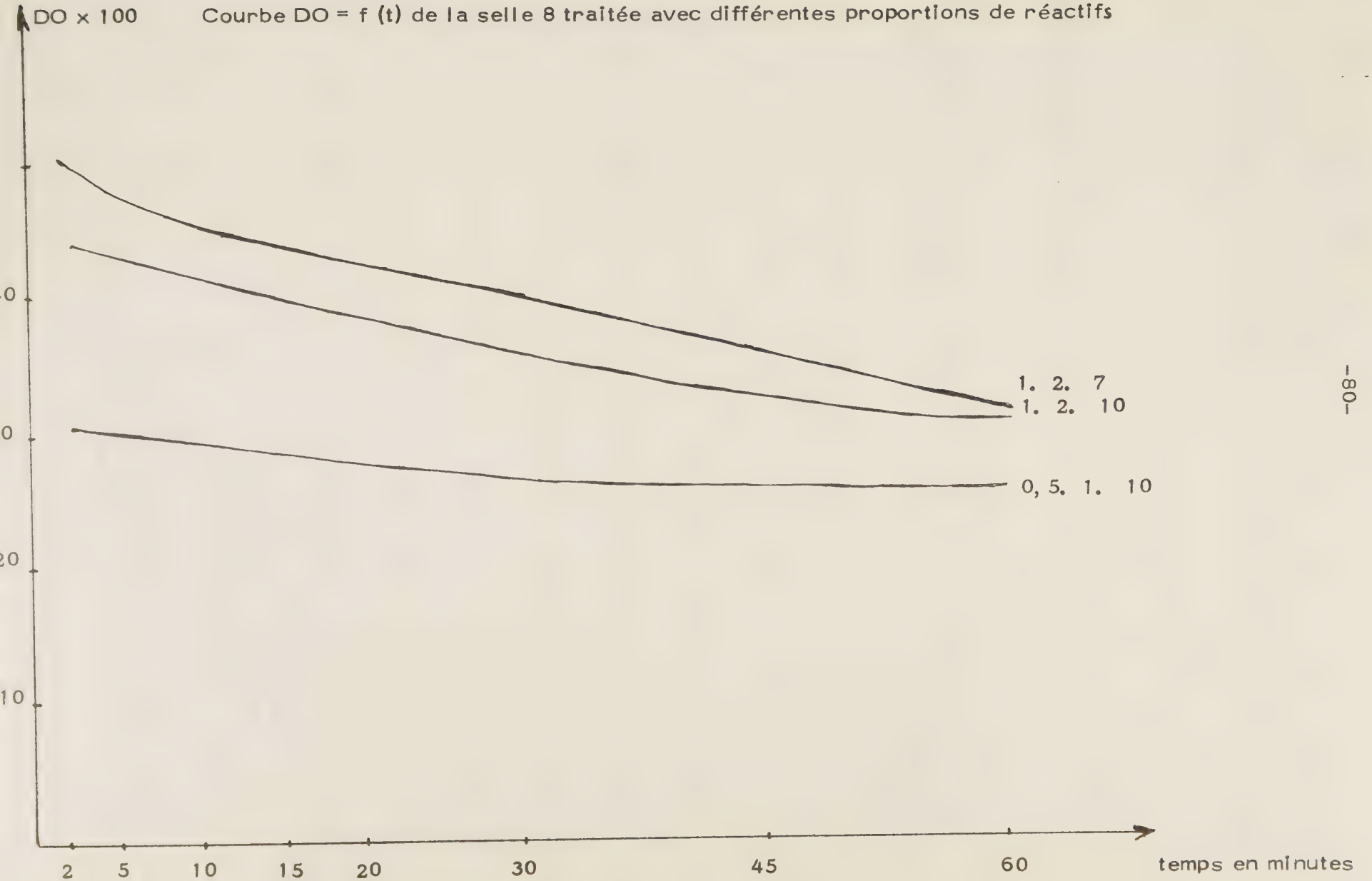
B - TEMPS D'ACTION DU REACTIF N N'

Lors de l'étude expérimentale de la réaction, nous avons montré l'influence du temps de contact entre la solution acide à doser et le réactif N N'. Au bout de 30 minutes, nous aboutissions à un palier définissant le temps d'action minimum pour que la réaction soit complète.
Dans le cadre de l'analyse de selles où plusieurs composés interviennent, nous allons rechercher si ce palier est le même.
Prenons 3 selles (11. 12. 13) que nous dosons dans les conditions précédemment définies de dilution. Les temps sont : 15. 30. 45. 60 et 120 minutes. Après l'addition du réactif hydroxylamine-soude, le temps de 15 minutes, déjà déterminé suffit. Nous testons avec 7 ml de perchlorate.
Les densités optiques obtenues après réaction sont groupées dans le tableau suivant (DO x 100).

Temps d'action (mn)	15	30	45	60	120
Selle 11	48	59	60	60	59
12	58	72	71	72	72
13	46	55	55	56	54

Il apparait un palier au bout de 30 minutes qui se maintient par la suite.

GRAPHIQUE XXV



C - TABLEAU RECAPITULATIF

Les facteurs de sensibilisation définis lors de l'étude analytique de la réaction de PESEZ se retrouvent dans celle appliquée au dosage fécal.
Nous résumons dans le tableau XXII les modifications apportées au dosage en traitant 3 selles 14. 15. 16 dans toutes les conditions (cf. tableau XVII)

TABLEAU XXII

Résultats obtenus à partir de 3 selles après modifications de la réaction de PESEZ appliquée aux selles.

Proportions Selles	Réactif au perchlorate (ml)	Prise d'essai (ml)	Solution du réactif N N' 1 % (ml)	Densité optique (DO x 100)	
				après 15' réactif NN'	après 30' réactif NN'
14	10	0, 5	1	28	36
		1	2	40	49
	7	0, 5	1	33	39
		1	2	47	54
15	10	0, 5	1	18	27
		1	2	31	39
	7	0, 5	1	22	29
		1	2	36	48
16	10	0, 5	1	15	17
		1	2	18	26
	7	0, 5	1	17	19
		1	2	23	29

Nous notons une augmentation de la densité optique dans trois cas :
- diminution du volume de perchlorate
- volume double de prise d'essai
- augmentation du temps de contact entre le réactif N N' et la solution acide.

En fait, seuls les deuxième et troisième facteurs, sont intéressants ; la diminution du volume de perchlorate entraine une instabilité très importante pour une faible amélioration.
Disposons les résultats sous forme d'un tableau en les comparant à ceux obtenus par la méthode de BAILENGER à titre indicatif.

Selles	Densité optique(DOx100)	Méthode de BAILENGER (ml)
14	49	20
15	39	16
16	26	12

Nous avons dosé trois selles d'acidités différentes : élevée, normale, faible. La densité optique traduisant l'acidité d'une selle normale (selle 15) est ici voisine de 0,40, valeur optimum que nous voulions atteindre en sensibilisant la méthode de PESEZ.
Par cette méthode, l'éventail des chiffres de densité optique est plus large que le nombre de ml de la méthode volumétrique. Donc nous avons une plus grande souplesse de résultats et une meilleure différenciation.
Nous proposons une technique quantitative que nous appliquerons à quelques selles afin d'interpréter les résultats.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

II - TECHNIQUE PROPOSEE

A - REACTIFS

1° - Soluté officinal de perchlorure de fer
2° - Chaux hydratée en poudre
3° - Acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$
4° - Acide chlorhydrique $\frac{N}{1000}$
5° - Solution méthanolique à 1 % de N N' dicyclohexylcarbodiimide conservée depuis moins de 4 jours à + 4° C.
6° - Solution d'hydroxylamine à 10 % dans le méthanol de moins de 10 jours conservée à la température du laboratoire
7° - Solution de soude à 10 % dans le méthanol de moins de 10 jours conservée à la température du laboratoire
8° - Solution-mère de perchlorate de fer conservée à la température du laboratoire sans limite de temps qui servira à la préparation de la solution extemporanée.

B - TECHNIQUE

1° - Eclaircissement de la selle

Peser 10 g de selles dans un verre à pied.
Diluer avec 50 ml d'eau distillée ajoutés par petites quantités en s'aidant d'un agitateur.
Le pH est voisin de la neutralité
La dilution est de $\frac{1}{5}$
Ajouter 1 ml de perchlorure de fer et mélanger puis une pincée (2 g environ) de chaux hydratée en poudre, bien mélanger, laisser reposer quelques minutes avant de passer sur filtre plissé dans un tube à essai.
On obtient un liquide jaune très limpide.
Le pH est très alcalin voisin de 12, 5
On en prélève 5 ml que l'on ajuste à pH 3 au moyen d'un pH-mètre, par l'acide chlorhydrique $\frac{N}{5}$ ajouté goutte à goutte. Il en faut 1, 5 à 2 ml en général. On note le volume afin de compléter à 7, 5 ml par de l'eau distillée. La dilution est de $\frac{1}{7,5}$

2° - Réaction

Elle se fait à la température du laboratoire dans un tube à essai

- Estérification en présence de déshydratant

A 1 ml de la dilution on ajoute 2 ml du réactif N N' dicyclohexylcarbodiimide ; agiter; laisser agir pendant 30 minutes. Parallèlement on effectue la réaction sur un témoin : 1 ml de la solution d'acide chlorhydrique $\frac{N}{1000}$

- Action de l'hydroxylamine en milieu alcalin

Après 30 minutes ajouter 1 ml du filtrat du mélange à parties égales des solutions d'hydroxylamine et de soude ; agiter, laisser agir 15 minutes.

- Développement de la coloration

Au bout de ce temps, ajouter 10 ml de réactif au perchlorate juste préparé ; agiter, la coloration est violette.

3° - Lecture

Exactement cinq minutes après, lire la densité optique à 500 nm en cuves de 10 mm contre le blanc réactif.

C - EXPRESSION DES RESULTATS

Nous exprimons la teneur en acides organiques des selles en ml d'acide acétique N contenus dans 100 g. Nous présentons les résultats d'une dizaine de selles. Nous reportons les densités optiques sur la droite de référence établie pour l'acide acétique par la méthode modifiée (graphique XXIII) Nous obtenons donc le nombre de µg d'acides organiques exprimés en acide acétique contenus dans 1 ml de selle diluée au $\frac{1}{7,5}$ c'est-à-dire dans $\frac{1}{7,5}$ g de selle. Dans 100 g cette quantité est multipliée par 750. Le nombre de ml de solution N d'acide acétique dans 100 g de selle est donc obtenu par le coéfficient $\frac{750}{60\,000}$ c'est à dire $\frac{1}{80}$. Pour simplifier, nous établissons une droite donnant directement à partir de la densité optique, le nombre de ml de CH_3 COOH N contenu dans 100 g de selles (graphique XXVI)

Dans le tableau XXIII, nous étudions pour chaque selle :

- la densité optique obtenue
- les résultats donnés parles graphiques XXIII et XXVI
- un rapport de corrélation établi par référence à la méthode de BAILENGER à titre indicatif. C'est le nombre de ml trouvé dans notre technique sur celui trouvé dans la méthode de BAILENGER. La moyenne de ces rapports (0, 54) se trouve abaissée par les chiffres obtenus à partir des selles de faible acidité (selles 21 et 23) : il semble en effet que les volumes diminuent de façon beaucoup plus notable dans la technique modifiée de PESEZ

La zone physiologique d'acidité se situe entre 8, 5 ml et 10, 5 ml mais pour établir cela, nous nous basons sur les résultats donnés par la méthode de BAILENGER qui peut être, parfois, imprécise.

D - COMPARAISON GENERALE DE CES TECHNIQUES ETUDIEES

Après l'exposé de chaque méthode et de son application au dosage fécal, nous avons fourni quelques résultats. Nous groupons ici les plus significatifs : tableau XXIV. Nous comparons les graphiques I, X et XXIII indiquant que ces trois réactions sont quantitatives, en nous basant :

- sur le seuil de sensibilité en µg d'une part, et en normalité d'autre part
- sur la densité optique obtenue à partir d'une solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique
- sur la quantité d'acide en µg donnant une densité optique de 0, 40
- sur la normalité de la solution d'acide acétique donnant cette densité optique de 0, 40
- sur l'application au dosage fécal

La sensibilité de la réaction n'a pas été augmentée par les modifications et aurait même été légèrement diminuée, mais l'importance de la méthode modifiée réside surtout en le fait de doser des solutions plus diluées dans des conditions permettant un dosage précis (bonne lecture) et reproductible.

GRAPHIQUE XXVI

Droite de référence de notre méthode
(Les repères proviennent du dosage de l'acide acétique par la méthode modifiée).

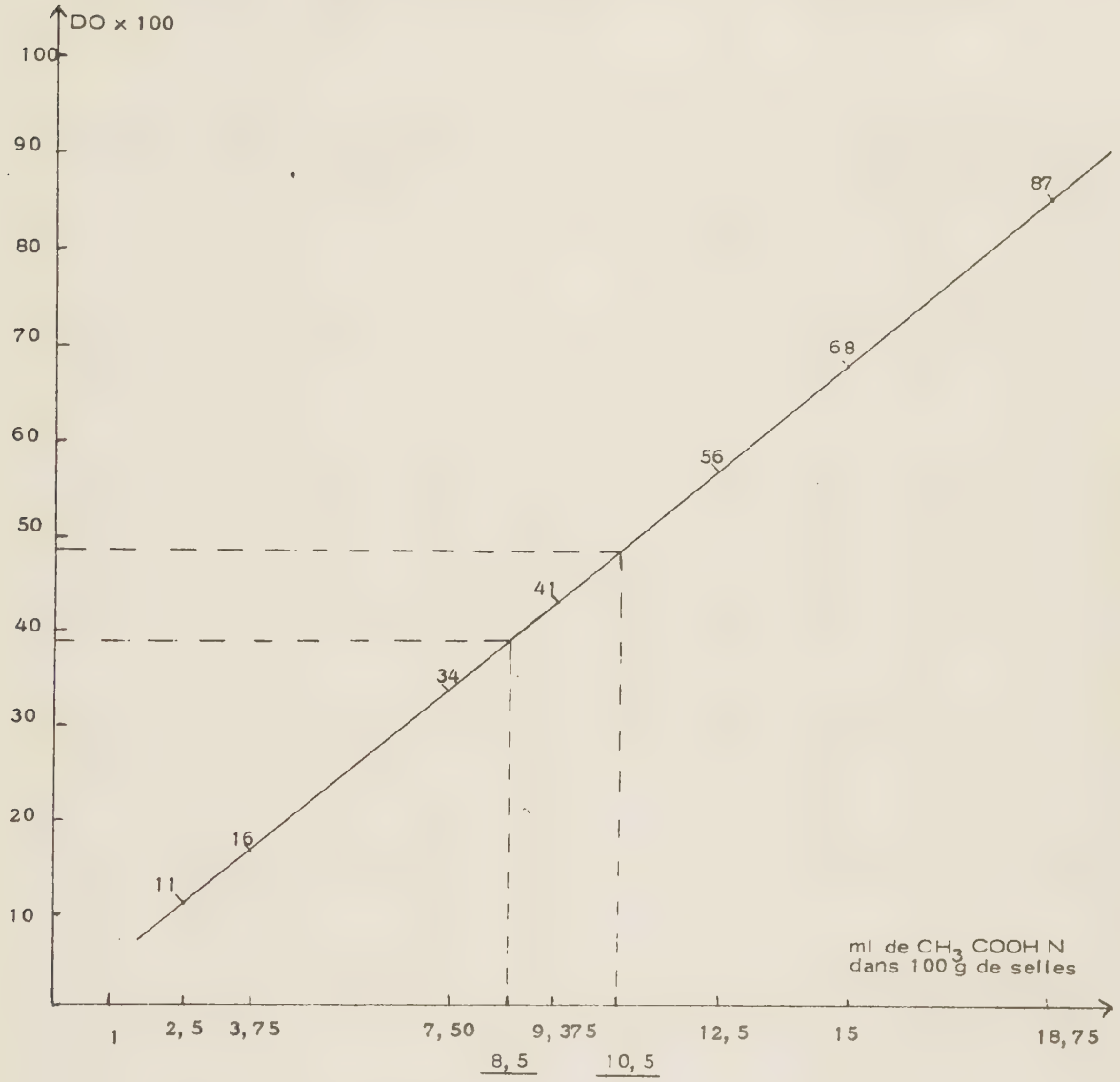


TABLEAU XXIII

Résultats obtenus par notre méthode à partir d'une dizaine de selles de teneurs variées en acides organiques.

Selles	Densité optique(DOx100)	µg/ml de selle diluée au 1/7,5	ml d'acide acétique N ds 100g de selles	méthode de BAILENGER (ml)	rapport de corrélation
14	49	890	11,1	20	0,55
15	39	710	8,9	16	0,50
16	26	480	6	12	0,50
17	42	760	9,5	15	0,63
18	50	910	11,2	17,3	0,64
19	66	1180	14,5	24	0,60
20	54	970	12,1	20	0,60
21	20	360	4,6	10,6	0,43
22	44	810	10,2	16	0,63
23	13	250	3,1	10,5	0,29
24	54	970	12,1	20	0,60
25	45	840	10,6	17	0,60

TABLEAU XXIV

Comparaison de trois méthodes quantitatives du dosage de l'acide acétique

Méthode	Seuil de sensibilité		Densité optique donnée par une solution $\frac{N}{50}$ d'acide acétique	Densité optique de 0,40 obtenue		Application au dosage fécal = Densité optique donnée par une selle normale
	µg	normalité		µg	normalité	
PESEZ décrite par l'auteur (graph. I)	200	$\frac{N}{150}$	0,30	800	$\frac{N}{37,5}$	non reproductible
PESEZ (pH, blanc réactif, temps de lecture) (graph. X)	120	$\frac{N}{250}$	0,40	600	$\frac{N}{50}$	0,25
Modifiée (graph. XXIII)	150	$\frac{N}{400}$	0,66	750	$\frac{N}{80}$	0,40

CONCLUSIONS GENERALES

A partir de la réaction hydroxamique appliquée aux acides aliphatiques par PESEZ, nous avons essayé d'effectuer le dosage biologique des acides organiques fécaux dont l'intérêt physio-pathologique est bien connu.

Toute réaction destinée à un dosage doit présenter les qualités suivantes, étroitement liées :

- reproductibilité
- quantitativité
- sensibilité

Nous les avons envisagées du double point de vue de la réaction elle-même et de son application à l'analyse fécale.

Du point de vue de la réaction proprement dite, nous avons établi la reproductibilité en précisant certains facteurs indispensables que PESEZ n'avait pas décrits : qualité des réactifs ; lecture contre un blanc ; pH ; délai de lecture après développement de la coloration très instable.

Nous avons montré que nous pouvions étendre à tous les acides de fermentation contenus dans les selles, le caractère quantitatif que PESEZ signalait seulement pour les acides formique et acétique.

Nous avons enfin constaté la bonne sensibilité ainsi obtenue ; seuls toutefois, les résultats du dosage fécal pouvaient nous en donner la véritable valeur.

Du point de vue de l'application biologique en effet, le dosage comportait deux difficultés :

- la clarification de la selle, indispensable à la bonne lecture d'une densité optique
- la dilution de la selle, limitée par sa faible teneur en acides organiques

Nous les avons résolues en conservant la méthode de clarification des selles de GOIFFON (perchlorure de fer - chaux) mais avec une dilution initiale au 1/5 et non au 1/10. Le liquide obtenu présentait une limpidité parfaite et les produits susceptibles d'interférer dans la réaction étaient systématiquement éliminés ; cependant la sensibilité était loin de la zone qui aurait rendu possible le dosage dans de bonnes conditions de reproductibilité.

L'augmentation du volume de prise d'essai a conduit à une très nette sensibilisation qui permettait de doser des solutions plus diluées mais ne traduisait pas réellement une amélioration de sensibilité. Celle-ci aurait pu être obtenue par l'emploi d'un volume de 7 ml de réactif au perchlorate au lieu de 10 ml mais l'instabilité accrue de la coloration rendait impossible une bonne lecture.

Nos dosages ont donc été faits avec une sensibilité moyenne, que nous avons pu adapter au faible taux d'acides organiques des selles. Les résultats sont exprimés en volume (en ml) d'acide acétique N dans 100 g de selles : c'est un acide de fermentation dont le choix comme acide de référence se justifie. Les volumes normaux sont ainsi de 8, 5 à 10, 5 ml dans 100 g de selles.

Cependant notre méthode est longue, nécessitant l'emploi d'un pH-mètre indispensable pour une manipulation à un pH très précis de 3. Elle conduit de plus à une coloration instable demandant une lecture après un délai de cinq minutes exactement, ce qui gêne les dosages en série.

Enfin l'instabilité des réactifs nous oblige à les préparer fréquemment, or cette préparation est à la fois dangereuse et difficile.

Cette méthode est toutefois plus précise que celle de BAILENGER qui présente l'inconvénient d'un virage d'indicateur délicat à saisir et d'une filtration sur charbon comportant des risques d'absorption des acides organiques. Elle donne également une gamme de résultats plus étendue surtout lorsqu'il s'agit de selles très faiblement acides.

-:-

BIBLIOGRAPHIE

1 - GOIFFON R. Manuel de coprologie clinique. 253 pages. Masson et Cie ed. Paris 1949. 5 ° édition.

2 - TAUZIN J. Guide coprologique pour l'interprétation clinique de l'examen des selles. 133 pages. Masson et Cie. ed. Paris 1958.

3 - BAILENGER J. Méthode de séparation et d'identification des acides organiques dans les selles. Bull. Soc. Pharm. Bx. 1962. 101. 137. 142.

4 - BAILENGER J. , ANDRIEUX M., DUBARRY JJ. Rapport entre le parasitisme intestinal et la nature des acides organiques présents dans les selles. Bull. Soc. Pharm. Bx. 1965. 104. 187. 189.

5 - LARUE M., et LABBE H.
in GOIFFON R. et NEPVEUX F. 6 -

6 - GOIFFON R. et NEPVEUX F. Mesure des acides organiques à sels calciques solubles dans les selles. C. R. Soc. Biol. 2 déc. 1922. 2. 1173.

7 - VAN SLYKE D. et PALMER E. J. Biol. Chem. 41. 467.

8 - BAILENGER J. Coprologie parasitaire et fonctionnelle. 314 pages. 1965. 2° édition. Bx. Drouillard. imp.

9 - PESEZ M. Note sur les réactions hydroxamiques des acides aliphatiques. Ann. Pharm. Fr. 1957. 15. 173-177

10 - FEIGL F., ANGER V., et FREHDEN O. Mikrochimie 1934 - 15. 9

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

TABLE DES MATIERES

LE DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES FECAUX

Pages

I - Intérêt physio-pathologique 1
A - La flore microbienne intestinale..... 1
B - Les acides organiques..... 1
C - Physio-pathologie..... 2

II - Méthodes actuelles..... 4
A - Méthode de GOIFFON et NEPVEUX..... 4
B - Méthode de GOIFFON et NEPVEUX modifiée par BAILENGER, CLYTI et LE HIR..... 5
C - Recherche d'une méthode nouvelle..... 6

PREMIERE PARTIE : LA REACTION DE PESEZ

I - Technique originale de PESEZ..... 8
A - Principe..... 8
B - Technique..... 9
C - Résultats..... 9
D - Possibilités d'application biologique..... 11

II - Etude expérimentale analytique..... 12
A - Qualité des réactifs utilisés..... 12
B - Eléments conditionnant la reproductibilité de la réaction..... 14
C - Caractère quantitatif..... 28
D - Sensibilité..... 43

III - Application à l'analyse fécale..... 44
A - pH..... 44
B - Clarification de la selle..... 45
C - Modification de la dilution finale..... 49
D - Proposition d'une technique..... 51

DEUXIEME PARTIE : TECHNIQUE DE PESEZ MODIFIEE

I - Modifications de la réaction de PESEZ..... 54
A - Volume des réactifs..... 54
B - Longueur d'onde..... 63
C - Température..... 63
D - Temps d'action des réactifs..... 66
E - Tableau récapitulatif..... 67

II - Proposition d'une technique quantitative..... 68
A - Conditions optimales..... 68
B - Caractère quantitatif..... 68
C - Résultats comparés de cette technique et de celle de PESEZ..... 70
D - Conservation des réactifs..... 70

TROISIEME PARTIE : APPLICATION A L'ANALYSE FECALE

I - Modification de la technique appliquée aux selles..... 77
A - Volume des réactifs..... 77
B - Temps d'action du réactif N N'..... 79
C - Tableau récapitulatif..... 81

II - Technique proposée..... 83
A - Réactifs..... 83
B - Technique..... 83
C - Expression des résultats..... 84
D - Comparaison générale de ces techniques étudiées..... 84

CONCLUSIONS GENERALES..... 88

BIBLIOGRAPHIE 91

-:-:-: